

Pentosestoffwechsel in halophilen Archaea

Abbauwege, Enzyme und transkriptionelle Regulation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jan-Moritz Sutter

Kiel 2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2010 bis April 2014 am Institut für allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. P. Schönheit

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. J. Heller

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 25.07.2014

Der Dekan

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bislang noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens. Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

.....

Jan-Moritz Sutter

Teile der während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurden beziehungsweise werden in den folgenden Artikeln veröffentlicht beziehungsweise zur Veröffentlichung eingereicht:

Ulrike Johnsen, **Jan-Moritz Sutter**, Henning Zaiß and Peter Schönheit (2013)

L-Arabinose degradation pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of L-arabinose dehydrogenase. *Extremophiles* 17(6): 897-909

Ulrike Johnsen, **Jan-Moritz Sutter**, Anne-Christine Schulz, Julia-Beate Tästensen and Peter Schönheit

XacR – a novel transcriptional regulator of D-xylose and L-arabinose catabolism in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*.

Jan-Moritz Sutter and Peter Schönheit

Identification and characterization of D-xylono-/ L-arabinolactonase in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*.

Inhalt

1 Zusammenfassung	6
2 Summary	9
3 Einleitung	12
4 Material und Methoden	23
4.1 Wachstum.....	23
4.1.1 Wachstum von <i>Haloferax volcanii</i>	24
4.1.2 Wachstum von <i>Halorhabdus utahensis</i>	26
4.2 Molekularbiologische Methoden.....	27
4.2.1 Isolierung von DNA	27
4.2.2 Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA	27
4.2.3 Polymerase Kettenreaktion.....	28
4.2.4 Standard Klonierung.....	32
4.2.5 Transformation eines Plasmides in <i>H. volcanii</i>	34
4.2.6 Deletion und Komplementation in <i>H. volcanii</i>	35
4.2.7 Transkriptnachweis mittels Northern Blot und RT-PCR	37
4.3 Promotoranalysen	39
4.3.1 Transkriptionsstartbestimmung.	39
4.3.2 Konstruktion von <i>bgaH</i> -Reportergenfusionen	40
4.3.3 Ortsspezifische Mutagenese	41
4.3.4 Messung der β -Galaktosidase.....	41
4.4 Analytische Methoden.....	42
4.4.1 Bestimmung von D-Xylose in Wachstumsüberständen	42
4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	42
4.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	42
4.4.4 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von Proteinen	43
4.4.5 Colorimetrische Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyzuckersäuren	44
4.4.6 Carbazol-Test	44
4.4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	45
4.5 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen	46
4.5.1 Reinigung von Proteinen	47
4.5.2 Charakterisierung von gereinigten Proteinen	49
4.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten in Zellextrakten.....	52

5 Ergebnisse	54
5.1 D-Xylose- und L-Arabinoseabbau in <i>Haloferax volcanii</i>	56
5.1.1 Beteiligung einer Lactonase (HVO_B0030) am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose	56
5.1.1.1 Transkriptanalyse der Lactonase	57
5.1.1.2 Nachweis der enzymkatalysierten Lactonbildung aus D-Xylose und L-Arabinose	58
5.1.1.3 Charakterisierung der rekombinanten Lactonase	62
5.1.1.4 Herstellung und Analyse einer Deletionsmutante der Lactonase	68
5.1.2 Transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus	70
5.1.2.1 Transkriptanalysen der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus.....	70
5.1.2.2 HVO_B0040 kodiert für einen Transkriptionsregulator (XacR) des Pentoseabbaus	72
5.1.2.3 XacR ist ein transkriptioneller Aktivator der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus....	73
5.1.2.4 Identifizierung eines Bereiches zur transkriptionellen Aktivierung.....	78
5.1.2.5 XacR ist ein Repressor seiner eigenen Synthese	81
5.2 D-Xylose- und D-Riboseabbau in <i>Haloarcula marismortui</i>.....	85
5.2.1 Enzymaktivitäten in Zellextrakten	85
5.2.2 Identifizierung und Charakterisierung der D-Xylonat- und D-Ribonat-Dehydratase	87
5.2.3 Identifizierung und Charakterisierung der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase	92
5.3 D-Xyloseabbau in <i>Halorhabdus utahensis</i>	96
5.3.1 Wachstum auf D-Xylose und Zellextraktmessungen	96
5.3.2 Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten D-Xylose-Isomerase	97
6 Diskussion	100
6.1 D-Xylose- und L-Arabinoseabbau in <i>Haloferax volcanii</i>	100
6.1.1 Beteiligung einer Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose	100
6.1.2 Transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus	105
6.2 D-Xylose- und D-Riboseabbau in <i>Haloarcula marismortui</i>.....	110
6.2.1 D-Xylonat-Dehydratase und D-Ribonat-Dehydratase.....	110
6.2.2 α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase	114
6.3 D-Xyloseabbau in <i>Halorhabdus utahensis</i>	115
6.3.1 D-Xylose-Isomerase	115
6.4 Zusammenfassung der Pentoseabbauwege in halophilen Archaea	117
6.4.1 Abbauwege und Enzyme.....	117
6.4.2 Genominformationen zum Pentoseabbau in halophilen Archaea.....	119
7 Literaturverzeichnis.....	122

1 Zusammenfassung

Der Pentosestoffwechsel und dessen Regulation sind in Archaea nur wenig untersucht. Bisherige Untersuchungen in dem Haloarchaeon *Haloferax volcanii* zum D-Xylose- und L-Arabinoseabbau haben ergeben, dass die Pentosen oxidativ zu α -Ketoglutarat umgewandelt werden. Die erste Reaktion dieses Abbauweges wird durch zwei distinkte Dehydrogenasen, die D-Xylose-Dehydrogenase und die L-Arabinose-Dehydrogenase, katalysiert. An der weiteren Umsetzung von D-Xylonat und L-Arabinat zu α -Ketoglutarat sind die gleichen Gene beteiligt, die für die D-Xylonat-Dehydratase, die 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase und die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodieren. Alle Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus bilden ein Gencluster, das zusätzlich die Gene einer hypothetischen Lactonase (HVO_B0030) und des hypothetischen Transkriptionsregulators XacR (HVO_B0040) enthält. Ob die Lactonase und der Regulator XacR am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose beziehungsweise dessen transkriptioneller Regulation beteiligt sind, ist nicht bekannt. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass *Haloarcula marismortui* auf den Pentosen D-Xylose und D-Ribose wächst, wobei der erste Schritt des Pentoseabbaus von einer bifunktionellen D-Xylose-/ D-Ribose-Dehydrogenase katalysiert wird, was auf einen oxidativen Abbau hindeutet. Die weiteren Schritte des oxidativen Pentoseabbaus wurden bisher nicht untersucht. Vergleichende Genomanalysen mit *Halorhabdus utahensis*, der ebenfalls D-Xylose als Wachstumssubstrat verwerten kann, haben ergeben, dass die Gene des oxidativen Pentoseabbaus in *H. utahensis* fehlen, dagegen konnten die Gene einer D-Xylose-Isomerase (Huta_2443) und einer D-Xylulose-Kinase (Huta_2446) identifiziert werden. Dies deutet darauf hin, dass dieses Haloarchaeon, wie die meisten Bacteria, D-Xylose zu D-Xylulose-5-Phosphat abbaut.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Pentoseabbau in drei Haloarchaeen durchgeführt. In *H. volcanii* wurde die Beteiligung einer Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose sowie die transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus durch den Transkriptionsregulator XacR untersucht. Aus *H. marismortui* Zellen wurden die Schlüsselenzyme des oxidativen Pentoseabbaus gereinigt und die kodierenden Gene identifiziert. Nach der Überexpression wurden die rekombinanten Enzyme gereinigt und charakterisiert. In *H. utahensis* Zellextrakten wurden die Aktivitäten der D-Xylose-Isomerase und der D-Xylulose-Kinase gezeigt, ferner wurde die rekombinante D-Xylose-Isomerase nach Überexpression gereinigt und charakterisiert.

D-Xylose- und L-Arabinoseabbau in *Haloferax volcanii*

Nachweis und Charakterisierung einer Lactonase. Das Gen HVO_B0030 kodiert für eine putative Lactonase. Northern Blot-Analysen zeigten eine transkriptionelle Induktion dieser Lactonase beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose im Vergleich zu D-Glucose. Mit HPLC-Analysen wurde gezeigt, dass die D-Xylose-Dehydrogenase die Umsetzung von D-Xylose zu D-Xylonolacton und die L-Arabinose-Dehydrogenase die Umsetzung von L-Arabinose zu L-Arabinolacton katalysieren. Die gereinigte rekombinante Lactonase katalysierte die Umsetzung der beiden Lactone zu den entsprechenden Säuren, D-Xylonat beziehungsweise L-Arabinat. Eine chromosomale Deletionsmutante der Lactonase zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein eingeschränktes Wachstum auf L-Arabinose. Durch eine *in trans* Komplementation mit HVO_B0030 konnte der Wachstumsphänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden. Die Daten deuten darauf hin, dass HVO_B0030 für eine Lactonase kodiert, die funktionell am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose beteiligt ist. Dies ist die erste Beschreibung einer Lactonase des Pentoseabbaus in der Domäne der Archaea.

Transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus. Die Transkriptanalysen aller Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus zeigten eine transkriptionelle Induktion, sowohl beim Wachstum auf D-Xylose als auch auf L-Arabinose. Dies deutet auf einen gemeinsamen pentosespezifischen Transkriptionsregulator hin. Neben dem Gencluster der Gene des Pentoseabbaus wurde der hypothetische Transkriptionsregulator XacR, kodiert von HVO_B0040, identifiziert. Um zu prüfen, ob XacR an der Regulation des Pentoseabbaus beteiligt ist, wurden die Transkripte der Gene des Pentoseabbaus im Wildtyp mit einer Deletionsmutante von XacR verglichen. Es zeigte sich, dass die Transkripte dieser Gene nach der Induktion durch die Pentosen nur im Wildtyp, jedoch nicht in der Deletionsmutante von XacR nachgewiesen werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass XacR als Transkriptionsaktivator der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus fungiert. Eine mögliche Aktivatorbindestelle wurde durch Promotoranalysen identifiziert. Dazu wurden die β -Galaktosidase Aktivitäten von *bgaH*-Reporter-genfusionen des D-Xylonat-Dehydratase Promotors bestimmt. Durch Deletionsmutagenese dieses Promotors wurde ein für die Aktivierung essentieller Bereich von 11 bp stromaufwärts der TATA-Box identifiziert, denn die Deletion dieses Bereiches führte zu einem Verlust der β -Galaktosidase Aktivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass XacR einen Repressor seiner eigenen Synthese darstellt, da die Deletion des XacR Gens zu einer erhöhten Promotoraktivität des XacR Promotors führte. In dem Promotor von XacR wurde

eine AT-reiche palindromische Sequenz identifiziert, deren Mutagenese ebenfalls zu einer erhöhten XacR Promotoraktivität führte. Das Motiv stellt eine mögliche Bindestelle für XacR als Repressor dar. Dies ist die erste Beschreibung eines Transkriptionsregulators des Pentoseabbaus in der Domäne der Archaea.

D-Xylose- und D-Riboseabbau in *Haloarcula marismortui*

Extrakte aus D-Xylose und D-Ribose gewachsenen *H. marismortui* Zellen katalysierten die Umsetzung von D-Xylonat beziehungsweise D-Ribonat zu α -Ketoglutarat. In diesen Extrakten konnten die Aktivitäten einer D-Ribonat-Dehydratase (RAD), einer D-Xylonat-Dehydratase (XAD) sowie einer α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH) nachgewiesen werden. Die Enzyme wurden partiell gereinigt und die kodierenden Gene mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie identifiziert. Die Proteine wurden in *H. volcanii* überexprimiert und die rekombinanten Enzyme charakterisiert. Die RAD zeigte eine hohe Spezifität für D-Ribonat, dagegen setzte die XAD neben D-Xylonat auch D-Gluconat um, dabei wurde D-Gluconat mit einer signifikant höheren Aktivität umgesetzt. Die KGSADH katalysierte die Umsetzung von α -Ketoglutarat-Semialdehyd zu α -Ketoglutarat. Die Ergebnisse zeigen, dass die identifizierten Enzyme aus *H. marismortui* an der Umsetzung von D-Xylonat und D-Ribonat zu α -Ketoglutarat beteiligt sind.

D-Xyloseabbau in *Halorhabdus utahensis*

In Extrakten von D-Xylose gewachsenen *H. utahensis* Zellen konnten die Aktivitäten der Schlüsselenzyme des oxidativen D-Xyloseabbaus, D-Xylose-Dehydrogenase und α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase, nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurden die Aktivitäten einer D-Xylose-Isomerase und einer D-Xylulose-Kinase gemessen, den typischen Enzymen des bakteriellen D-Xyloseabbaus zu D-Xylulose-5-Phosphat. Die putative D-Xylose-Isomerase, kodiert von Huta_2443, wurde in *H. volcanii* überexprimiert, gereinigt und charakterisiert. Das Enzym katalysierte die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose mit einer deutlich höheren katalytischen Effizienz als die Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose. Die Daten deuten darauf hin, dass das Haloarchaeon *H. utahensis* D-Xylose, wie die meisten Bacteria, mit einer D-Xylose-Isomerase und einer D-Xylulose-Kinase zu D-Xylulose-5-Phosphat abbaut und nicht oxidativ zu α -Ketoglutarat, wie *H. volcanii* und *H. marismortui*.

2 Summary

The pentose catabolism and its regulation are not studied well in the domain of archaea. Recent analyses revealed that the haloarchaeon *Haloferax volcanii* degrades D-xylose and L-arabinose to α -ketoglutarate by an oxidative pathway. The initial reactions of this pathway are catalyzed by two distinct dehydrogenases, the D-xylose dehydrogenase and the L-arabinose dehydrogenase. Further degradation of both D-xylonate and L-arabinoate to α -ketoglutarate involves the same genes coding for D-xylonate dehydratase, 2-keto-3-deoxyxylonate dehydratase and α -ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase. All genes of D-xylose and L-arabinose catabolism form a cluster, which also contains genes coding for putative lactonase (HVO_B0030) and putative transcriptional regulator XacR (HVO_B0040). The functions of this putative lactonase and the regulator XacR have not been analyzed. In previous studies growth of *Haloarcula marismortui* on D-xylose and D-ribose was reported. The initial reaction of pentose degradation is catalyzed by a promiscuous D-xylose/ D-ribose dehydrogenase, indicating an oxidative pathway. The further enzymes involved in this pathway have not been identified so far. Comparative genome analyses with haloarchaeon *H. utahensis*, which also growth on D-xylose, revealed that genes of an oxidative pathway are missing. Instead genes coding D-xylose isomerase (Huta_2443) and D-xylulose kinase (Huta_2446) are present, indicating that *H. utahensis* degrades D-xylose to D-xylulose-5-phosphate, as demonstrated for most bacteria.

In this thesis the pentose degradation pathways were investigated in three haloarchaea. In *H. volcanii* the involvement of a lactonase in D-xylose and L-arabinose degradation was demonstrated. In addition the function of XacR as a transcriptional activator of genes involved in pentose degradation was characterized. The key enzymes of oxidative pentose degradation pathway were purified from *H. marismortui* cells and the coding genes were identified. The enzymes were expressed and the recombinant proteins were purified and characterized. The activities of D-xylose isomerase and D-xylulose kinase were measured in cell extracts of *H. utahensis* and recombinant D-xylose isomerase was purified and characterized.

D-xylose and L-arabinose degradation in *Haloferax volcanii*

Analyses and characterization of D-xylo- and L-arabinolactonase. Transcript analyses of the gene HVO_B0030, encoding a putative lactonase, revealed a specific transcriptional induction by D-xylose and L-arabinose as compared to D-glucose. HPLC analyses provided evidence that D-xylose dehydrogenase and L-arabinose dehydrogenase catalyzed the conversion of D-xylose to D-xylonolactone and of L-arabinose to L-arabinolactone, respectively. The recombinant lactonase catalyzed the conversion of both lactones to the respective acids, D-xylonate and L-arabinoate. A chromosomal deletion mutant of the lactonase caused a restricted growth phenotype on L-arabinose, which could be complemented with HVO_B0030 in trans. The data indicate that the lactonase encoded by HVO_B0030 is functionally involved in D-xylose and L-arabinose degradation. This is the first report of a lactonase involved in pentose degradation in the domain of archaea.

Transcriptional regulation of genes involved in D-xylose and L-arabinose degradation.

Transcript analyses of genes involved in D-xylose and L-arabinose degradation revealed a transcriptional induction by both D-xylose and L-arabinose, indicating a common pentose specific transcriptional regulator. Adjacent to the gene cluster of pentose degradation, a putative transcriptional regulator XacR, encoded by HVO_B0040, was identified. To test whether XacR functions as transcriptional regulator of genes of D-xylose and L-arabinose catabolism, transcript levels of the pentose specific genes were compared in the wild type and the *xacR* deletion mutant. The transcripts of all pentose specific genes were detected after induction by pentoses only in the wild type and not in the XacR deletion mutant. This indicates that XacR is a transcriptional activator of genes involved in D-xylose and L-arabinose degradation. A putative transcriptional activator binding site was identified by promoter analyses of D-xylonate dehydratase. The promoter activity was measured with a reporter gene system following the activity of a β -galactosidase. Deletion mutagenesis of this promoter revealed a region of 11 bp upstream of the TATA-box to be essential for transcriptional activation. Deletion of this region caused loss of the β -galactosidase activity. Besides its activator function, XacR acted as repressor of its own synthesis, since *xacR* deletion resulted in an increase of *xacR* promoter activity. A palindromic sequence was identified in the *xacR* promoter and mutation of this sequence also resulted in an increase and thus derepression of *xacR* promoter activity. This leads to the conclusion that the palindromic sequence represents the binding site of XacR as repressor. This is the first report of a transcriptional regulator of pentose catabolism in the domain of archaea.

D-xylose and D-ribose degradation in *Haloarcula marismortui*

Extracts of D-xylose and D-ribose grown *H. marismortui* cells catalyzed the conversion of both D-xylurate and D-ribonate to α -ketoglutarate. In addition activities of D-ribonate dehydratase, D-xylurate dehydratase and α -ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase were detected in cell extracts. These enzymes were purified and the coding genes were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Furthermore, the recombinant enzymes were expressed in *H. volcanii*, purified and characterized. The D-ribonate dehydratase was specific for D-ribonate, whereas the D-xylurate dehydratase catalyzed the conversion of both D-xylurate and D-gluconate, with a significant higher activity for D-gluconate. α -ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase catalyzed the conversion of α -ketoglutarate semialdehyde to α -ketoglutarate. The data indicate the involvement of the identified enzymes in the conversion of D-xylurate and D-ribonate to α -ketoglutarate.

D-xylose degradation in *Halorhabdus utahensis*

In extracts of D-xylose grown *H. utahensis* cells the activities of the key enzymes of the oxidative D-xylose degradation pathway of *H. volcanii* and *H. marismortui*, D-xylose dehydrogenase and α -ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase, could not be detected. In contrast activities of D-xylose isomerase and D-xylulose kinase, the typical enzymes of bacterial D-xylose degradation to D-xylulose-5-phosphate, were found. The putative D-xylose isomerase encoded by Huta_2443 was expressed in *H. volcanii* and the recombinant enzyme was purified and characterized. The enzyme catalyzed the conversion of D-xylose to D-xylulose with a significant higher catalytic efficiency than the conversion of D-glucose to D-fructose. The data indicate that *H. utahensis* degrades D-xylose to D-xylulose-5-phosphate involving D-xylose isomerase and D-xylulose kinase, as demonstrated for most bacteria.

3 Einleitung

Auf Grund von Sequenzvergleichen prokaryotischer und eukaryotischer 16 S- beziehungsweise 18 S-rRNA konnte der phylogenetische Stammbaum des Lebens in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea gegliedert werden (Abbildung 1) (Woese 1987; Woese et al. 1990). Die Archaea wurden ursprünglich in die zwei Phyla Euryarchaeota und Crenarchaeota unterteilt (Woese 1987; Woese et al. 1990). Diese wurden um die Phyla der Korarchaeota (Elkins et al. 2008), Nanoarchaeota (Huber et al. 2002), Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al. 2008; Spang et al. 2010) und Aigarchaeota (Nunoura et al. 2011) erweitert. Im Gegensatz zu diesen eher kleinen Phyla, die zum Teil nur einen Organismus umfassen, weisen die zwei klassischen Phyla der Euryarchaeota und der Crenarchaeota eine Vielzahl von Organismen auf.

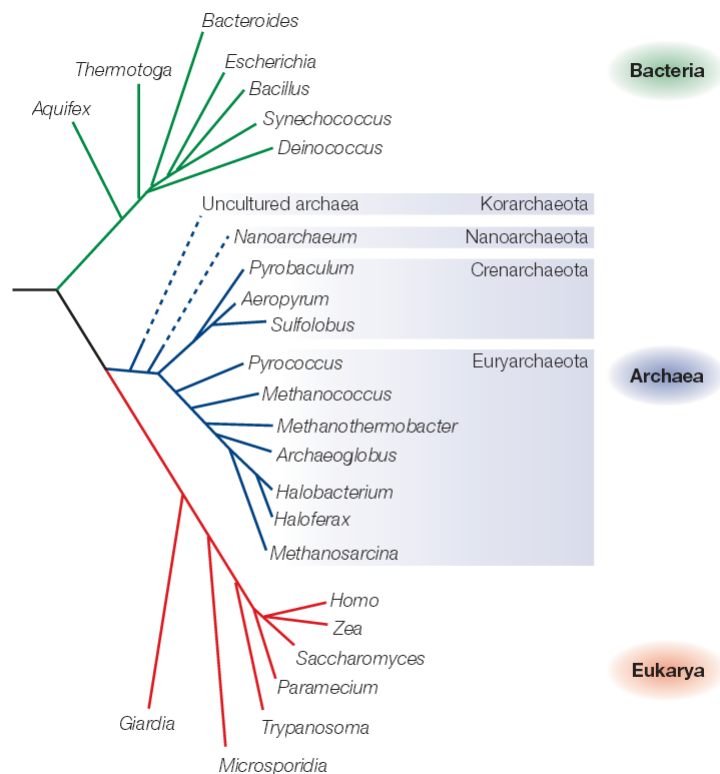


Abbildung 1 Phylogenetischer Stammbaum des Lebens basierend auf 16 S- beziehungsweise 18 S-rRNA Sequenzvergleichen (Allers and Mevarech 2005).

Zu den Crenarchaeota gehören überwiegend anaerobe, schwefelabhängige Ordnungen, die zum großen Teil hyperthermophile Spezies wie die *Desulfurococcales*, *Thermoproteales* und *Sulfolobales* umfassen (Huber H and Prangishvili D 2006; Burggraf et al. 1997). Zur Ordnung der *Sulfolobales* gehört die Gattung *Sulfolobus*, deren Vertreter aerob, chemoorgano- und

chemolithotroph wachsen können und deren Wachstumsoptimum bei 75 bis 85 °C und bei pH-Werten von 2 bis 3 liegt (Brock et al. 1972; Zillig et al. 1980; Seegerer and Stetter 1992). Im Gegensatz zu den Crenarchaeota weist das Phylum der Euryarchaeota eine hohe Diversität in Bezug auf Lebensraum und Physiologie auf. Neben hyperthermophilen und thermoacidophilen Organismen, wie *Pyrococcus* und *Picrophilus*, sind auch mesophile methanogene wie *Methanosarcina* und halophile Organismen aus der Ordnung der *Halobacteriales* vertreten.

Die phylogenetische Einordnung in die drei Domänen spiegelt sich auch in zahlreichen molekularen und biochemischen Unterschieden wieder. So ist zum Beispiel die Zellwand der Archaea im Gegensatz zu jener der Bacteria nicht aus Murein, sondern im Wesentlichen aus Proteinen, Glycoproteinen und Polysacchariden aufgebaut (Kandler and König 1998). Auch die aus Di- und Tetraetherlipiden bestehende Cytoplasmamembran der Archaea unterscheidet sich von der aus Glycerin-Fettsäure-Esterlipiden bestehenden Cytoplasmamembran der Eukarya und Bacteria (Langworthy and Pond 1986; De Rosa and Gambacorta 1988). Die Organismen der drei Domänen teilen allerdings auch eine Vielzahl von Merkmalen. So zeigt der basale Transkriptionsapparat der Archaea eine große Ähnlichkeit zu dem der Eukarya (Grohmann and Werner 2011). Während in Bacteria die RNA-Polymerase aus fünf Untereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) und einem variablen σ -Faktor aufgebaut ist, besteht die RNA-Polymerase in Archaea aus 11 bis 13 Untereinheiten und weist Homologien zur eukaryotischen RNA-Polymerase II auf (Murakami and Darst 2003; Jun et al. 2011). Die archaeellen Promotoren zeigen ebenfalls Homologien zu denen der Eukarya, so befindet sich etwa 25 bis 30 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine konservierte AT-reiche Sequenz, die sogenannte TATA-Box. Die Transkriptionsinitiation der Archaea benötigt zwei Proteine, das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) und den Transkriptionsfaktor B (TFB), die homolog zu dem TBP und TFIIB der Eukarya sind (Hausner et al. 1996). Das TBP bindet an die TATA-Box, während das TFB an das „TFB recognition element“ (BRE) bindet, das sich direkt stromaufwärts der TATA-Box befindet. An diesen Proteinkomplex aus TBP und TFB kann die RNA-Polymerase binden, um die Transkription zu initiieren (Bell and Jackson 1998). Im Gegensatz zur basalen Transkription ähneln die meisten Transkriptionsregulatoren aus Archaea denen aus Bacteria (Decker and Hinton 2013; Hausner et al. 1996; Thomm 2007). Viele archaeelle Transkriptionsregulatoren weisen ein „helix-turn-helix“ Motiv für die DNA Bindung auf, das für die meisten bakteriellen Regulatoren typisch ist (Pabo and Sauer 1992). Die Transkriptionsregulatoren können die Transkription von Genen aktivieren und/oder reprimieren. Dabei befindet sich die DNA-Bindestelle der

Aktivatoren, die sogenannte „upstream activator sequence“ (UAS), meist stromaufwärts von dem BRE und der TATA-Box. Dagegen binden Repressoren in der Regel zwischen der TATA-Box und dem Transkriptionsstart, so dass die Anlagerung der RNA-Polymerase erschwert oder verhindert wird (Ouhammouch 2004; Brinkman et al. 2002; Fiorentino et al. 2003; Dahlke and Thomm 2002).

Halophile Archaea

Halophile Archaea kommen in natürlichen hypersalinen Biotopen, wie Salzlaken oder Salzseen, zum Beispiel dem Toten Meer in Jordanien/Israel, aber auch in Meersalzgewinnungsanlagen oder auf oberflächlich stark gesalzenen Lebensmitteln vor (Oren 2007). In diesen hypersalinen Biotopen leben neben Haloarchaea nur wenige Bacteria und Eukarya, die überwiegend halotolerante bis halophile Eigenschaften aufweisen. Um unter den hohen extrazellulären Salzkonzentrationen einem Wasserverlust durch Osmose entgegenzuwirken, haben sich zwei Anpassungsstrategien entwickelt. Die meisten halophilen Bacteria synthetisieren oder akkumulieren in der Zelle kompatible gelöste Substanzen, wie Glycinbetain, Ektoin oder die Zucker Saccharose und Trehalose, die eukaryontische Alge *Dunaliella* verwendet Glycerin (Oren 1999; Avron 1986). Hohe Konzentrationen dieser Substanzen haben keinen Einfluss auf die Faltung und Aktivität von Proteinen. Im Gegensatz dazu haben sich die extrem halophilen Archaea und wenige Bacteria (zum Beispiel *Halanaerobium*) durch die „salt-in“ Strategie an hypersaline Biotope angepasst. Hierbei wird KCl bis zu einer Konzentration von 4 M im Cytoplasma akkumuliert. Die cytoplasmatischen Proteine dieser Organismen sind an diese hohen Salzkonzentrationen angepasst. So weisen sie an ihrer Oberfläche einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren, wie Glutamat und Aspartat, und einen niedrigen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren auf (Dennis and Shimmin 1997). Die unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Seitenketten der sauren Aminosäuren sorgen für die Ausbildung einer stabilen Hydrathülle, die auch bei hohen Salzkonzentrationen erhalten bleibt (Lanyi 1974; Frolow et al. 1996).

Haloferax volcanii wurde 1975 erstmals aus dem Sediment des Toten Meeres isoliert und seit 1986 der Gattung *Haloferax* zugeordnet (Mullakhanbhai and Larsen 1975; Torreblanca et al. 1986). *H. volcanii* ist ein moderat halophiler Organismus mit einem optimalen Wachstum bei 1,7 - 2,5 M NaCl. Der Organismus wächst aerob, kann aber auch anaerob mit Hilfe der Nitratatmung wachsen (Mevarech and Werczberger 1985). *H. volcanii* wächst chemoorganotroph auf Minimalmedium mit Aminosäuren oder Kohlenhydraten als einziger

Kohlenstoff- und Energiequelle. In den letzten Jahren hat sich *H. volcanii* zum idealen archaeellen Modellorganismus entwickelt, zum Beispiel für Untersuchungen des Zuckerstoffwechsels. Das Genom von *H. volcanii* ist sequenziert und die Zellen können mit Plasmiden transformiert werden (Hartman et al. 2010). Mittlerweile wurden mehrere stabile auxotrophe Mutanten generiert, wie eine Uracil auxotrophe Mutante, bei der das *pyrE2* Gen deletiert ist, welches für die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase der Pyrimidin-Biosynthese kodiert. Mit Hilfe dieser auxotrophen Mutante und der sogenannten pop-in/ pop-out Methode können markerlose Deletionsmutanten von Genen generiert werden (Allers et al. 2004; Bitan-Banin et al. 2003). Außerdem wurde ein Expressionssystem etabliert, um halophile Proteine in *H. volcanii* als aktive Enzyme zu überexprimieren. Dies ist von Vorteil, da halophile Proteine im bisher angewendeten Überexpressionssystem in *Escherichia coli* häufig als inaktive Enzyme exprimiert wurden, die anschließend aufwendig entfaltet und zurückgefaltet werden mussten (Connaris et al. 1999). Kürzlich wurde ein *bgaH*-Reportersystem zur Analyse von Promotoren etabliert, mit dessen Hilfe Promotoraktivitäten von Genen über die Aktivität einer halophilen β -Galaktosidase bestimmt werden können (T. Allers, Nottingham, UK, unveröffentlicht).

Haloarcula marismortui wurde 1940 aus dem Sediment des Toten Meeres isoliert und seit 1990 der Gattung *Haloarcula* zugeordnet (Oren et al. 1990). Die Zellen sind mit einem optimalen Wachstum bei 3,4 – 3,9 M NaCl extrem halophil und wachsen aerob. *H. marismortui* wächst auf Medium mit Komplexbestandteilen, wie Casein oder Hefeextrakt und kann Substrate wie D-Glucose und D-Fructose in Gegenwart von Komplexmedium als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen.

Halorhabdus utahensis wurde im Jahr 2000 aus dem Sediment des Great Salt Lake in Utah (USA) isoliert und beschrieben (Wainø et al. 2000). Die Zellen sind extrem halophil mit einem optimalen Wachstum bei 4,6 M NaCl. *H. utahensis* wächst aerob auf D-Glucose, D-Fructose oder D-Xylose, wohingegen auf Casein oder Hefeextrakt kein Wachstum nachgewiesen wurde (Wainø et al. 2000).

Glucoseabbau in Bacteria und Archaea

Vergleichende Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel in Bacteria und Archaea haben ergeben, dass die klassischen aus Bacteria bekannten Abbauwege von D-Glucose über den Embden-Meyerhof- (EM) oder den Entner-Doudoroff-Weg (ED) in Archaea nicht vorkommen, sondern modifizierte Varianten dieser Wege (Siebers and Schönheit 2005). Im klassischen ED-Weg der Bacteria wird Glucose in der Regel von einer Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieses wird von einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert, das von einer 6-Phosphogluconat-Dehydratase weiter zu 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) umgesetzt wird. Eine KDPG-Aldolase spaltet KDPG zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP). Das GAP wird durch die klassischen Enzyme des EM-Wegs zu Pyruvat umgewandelt. Halophile Archaea, wie zum Beispiel *Haloarcula marismortui*, bauen Glucose über einen semiphosphorylierten ED-Weg ab. Dabei wird Glucose zunächst von einer Glucose-Dehydrogenase zu Gluconat oxidiert, das von der Gluconat-Dehydratase zu KDG umgesetzt wird. Nun wird das KDG von der 2-Keto-3-Desoxygluconat-Kinase zu KDPG phosphoryliert. Die 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase spaltet KDPG zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat (Johnsen et al. 2001). Für das thermoacidophile Euryarchaeon *Picrophilus torridus* wurde ein nicht-phosphorylierter ED-Weg beschrieben, während in dem thermoacidophilen Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* ein verzweigter ED-Weg identifiziert wurde (Reher et al. 2010; Lamble et al. 2005).

Pentoseabbau in Bacteria und Archaea

Untersuchungen haben ergeben, dass sich auch der Pentoseabbau in Archaea von den meisten Bacteria unterscheidet. Die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose, Hauptbestandteil der Hemicellulose pflanzlicher Zellwände, werden in den meisten Bacteria mit Hilfe von Isomerasen, Epimerasen und Kinasen zu D-Xylulose-5-Phosphat, einem Intermediat des Pentosephosphat Weges, abgebaut (Abbildung 2A und B) (David and Wiesemeyer 1970; HELLING and WEINBERG 1963). So wurde gezeigt, dass D-Xylose zunächst von der D-Xylose-Isomerase zu D-Xylulose umgesetzt wird, das von der D-Xylulose-Kinase anschließend zu D-Xylulose-5-Phosphat phosphoryliert wird. L-Arabinose wird im ersten Schritt von der L-Arabinose-Isomerase zu L-Ribulose umgesetzt, welches von einer Kinase zu L-Ribulose-5-Phosphat phosphoryliert wird. Es folgt eine Epimerisierung zu D-Xylulose-5-Phosphat (David and Wiesemeyer 1970; HELLING and WEINBERG 1963). Die transkriptionelle Regulation dieser Abbauwege ist gut untersucht. So fungieren in *Escherichia coli* die Regulatoren XylR und AraC als Aktivatoren (Song and Park 1997; Miyada et al. 1984). Für das Bakterium *Azospirillum brasiliense* wurde ein alternativer Abbauweg von L-Arabinose beschrieben. Dabei wird L-Arabinose oxidativ zu α -Ketoglutarat, einem Intermediat des Citratzyklus, umgewandelt. Die L-Arabinose wird im ersten Schritt von einer L-Arabinose-Dehydrogenase zum L-Arabinolacton oxidiert, das von einer L-Arabinolactonase zu L-Arabinolat hydrolysiert wird. Eine L-Arabinolat-Dehydratase setzt nun L-Arabinolat zu 2-Keto-3-Desoxy-Arabinolat um, das anschließend von der 2-Keto-3-Desoxy-Arabinolat-Dehydratase zu α -Ketoglutarat-Semialdehyd und weiter von einer α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu α -Ketoglutarat umgesetzt wird (Abbildung 2C) (Watanabe et al. 2006b). Es gibt erste Hinweise, dass auch D-Xylose von einigen Bacteria, zum Beispiel von *Caulobacter crescentus*, durch den alternativen Abbauweg zu α -Ketoglutarat umgesetzt wird, dabei werden die Gene des oxidativen D-Xyloseabbaus vermutlich von einem Transkriptionsregulator der LacI Proteinfamilie reguliert (Stephens et al. 2007a; Stephens et al. 2007b).

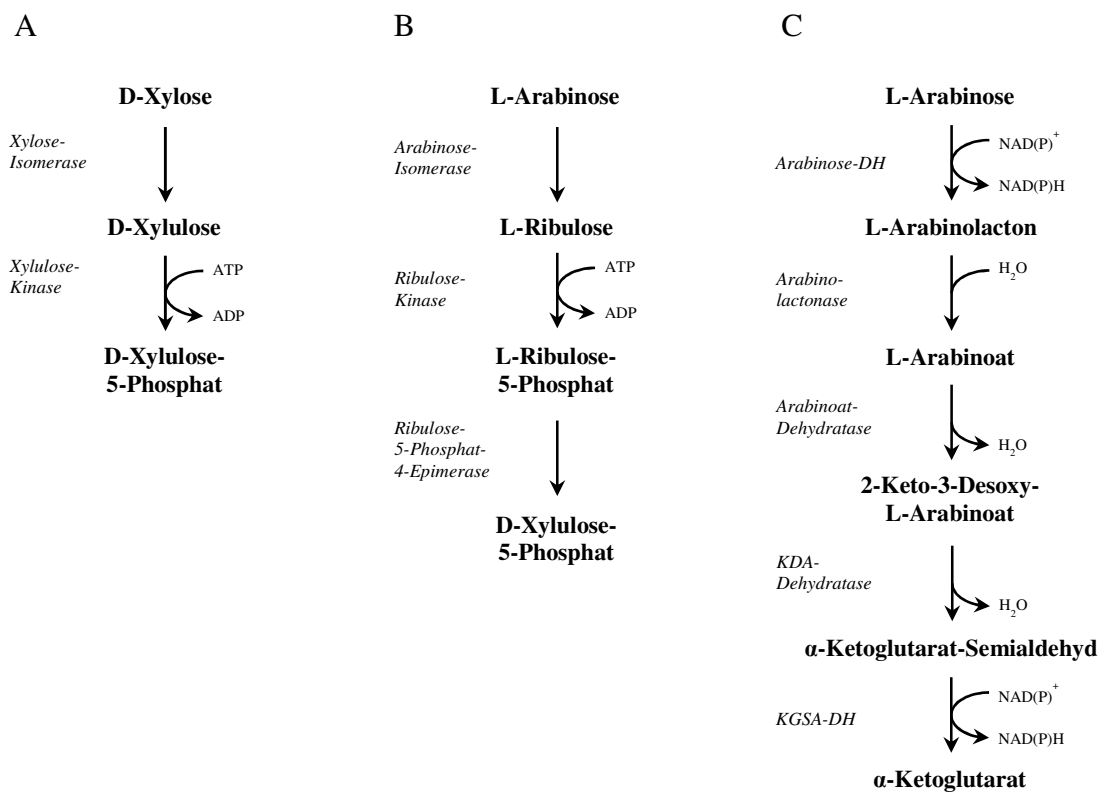


Abbildung 2 D-Xylose- und L-Arabinoseabbau in Bacteria. (A) Klassischer D-Xyloseabbau in Bacteria, zum Beispiel *Escherichia coli* (David and Wiesemeyer 1970). (B) Klassischer L-Arabinoseabbau in Bacteria, zum Beispiel *Escherichia coli* (HELLING and WEINBERG 1963). (C) Alternativer L-Arabinoseabbau in Bacteria, *Azospirillum brasiliense* (Watanabe et al. 2006b).

Bisherige Untersuchungen haben ergeben, dass sich der Abbau der Pentosen in Archaea von den meisten Bacteria unterscheidet. Archaea bauen Pentosen oxidativ über den alternativen Abbauweg zu α -Ketoglutarat ab. So wird im hyperthermophilen Organismus *Sulfolobus solfataricus* D-Arabinose durch eine D-Arabinose-Dehydrogenase, zwei Dehydratase Schritte sowie eine α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu α -Ketoglutarat umgesetzt (Brouns et al. 2006). Im Gegensatz zu *A. brasiliense* scheint in *S. solfataricus* keine Lactonase an dem oxidativen Pentoseabbau beteiligt zu sein (Brouns et al. 2006). Die transkriptionelle Regulation des oxidativen D-Arabinoseabbauwegs ist in *S. solfataricus* nur wenig untersucht. So wurde bisher nur eine D-Arabinose spezifische transkriptionelle Induktion der beteiligten Gene gezeigt sowie eine konservierte UAS als „arabox“ identifiziert. Allerdings wurde bisher noch kein Transkriptionsregulator identifiziert (Brouns et al. 2006; Lubelska et al. 2006; Peng et al. 2009).

Für *S. solfataricus* und auch für *S. acidocaldarius* konnte ferner gezeigt werden, dass die natürlich vorkommenden Pentosen D-Xylose und L-Arabinose zunächst von einer Dehydrogenase und einer pentosespezifischen Dehydratase zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat (KDX) beziehungsweise 2-Keto-3-Desoxy-L-Arabinat (KDA) umgewandelt werden. Anschließend werden KDX beziehungsweise KDA zu einem Anteil von 50 % von einer Aldolase zu Pyruvat und Glycolaldehyd gespalten. Der andere Anteil von 50 % wird von einer KDX-/ KDA-Dehydratase sowie einer α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu α -Ketoglutarat umgesetzt. Die initiale Dehydrogenase sowie die Aldolase katalysieren nicht nur den Abbau von Pentosen, sondern auch den Abbau von D-Glucose und D-Galactose im verzweigten ED-Weg (Nunn et al. 2010).

Neben den Pentoseabbauwegen durch die *Sulfolobus spec.* wurde kürzlich auch der Pentoseabbau in dem Haloarchaeon *Haloferax volcanii* aufgeklärt. *H. volcanii* wächst auf D-Xylose und L-Arabinose, nicht jedoch auf D-Ribose. Der erste Schritt des Abbaus von D-Xylose und L-Arabinose wird von zwei distinkten Dehydrogenasen katalysiert, der D-Xylose-Dehydrogenase und der L-Arabinose-Dehydrogenase (Abbildung 3). An der weiteren Umsetzung von D-Xylonat und L-Arabinat sind die gleichen Gene HVO_B0038A, HVO_B0027 und HVO_B0039, die für eine Xylonat-Dehydratase, eine 2-Keto-3-Desoxy-Xylonat-Dehydratase und eine α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodieren, essentiell beteiligt.

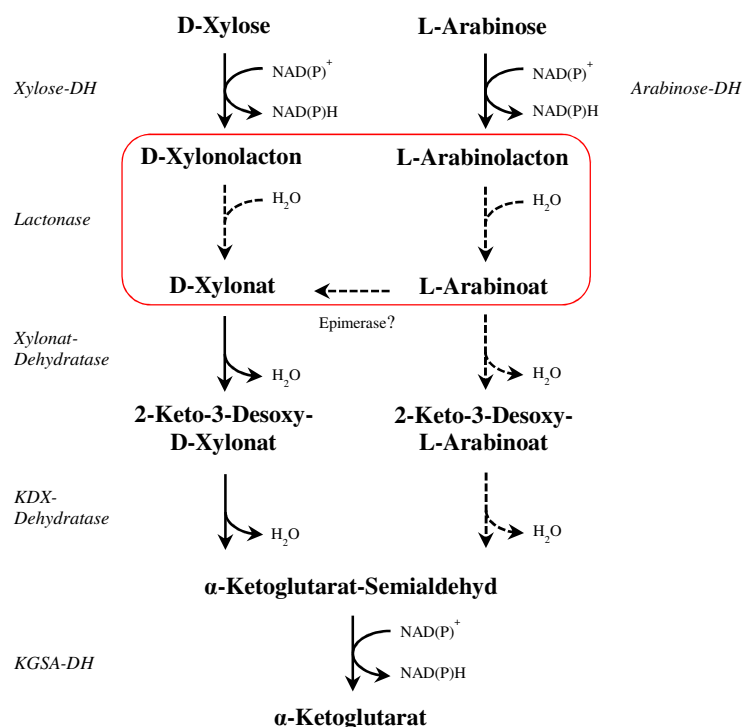


Abbildung 3 Postulierte Abbauwege von D-Xylose und L-Arabinose in *Haloferax volcanii* (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013). DH: Dehydrogenase, KDX: 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat, KGSA: α-Ketoglutarat-Semialdehyd. Die Reaktion der Lactonase, deren Beteiligung am Abbau der Pentosen bisher nicht gezeigt wurde, ist rot umrandet und gestrichelt dargestellt. Weitere nicht nachgewiesene Aktivitäten sind ebenfalls gestrichelt dargestellt. Die mögliche Beteiligung einer C4-Epimerase, die die Umsetzung von L-Arabinat zu D-Xylonat katalysiert, wurde diskutiert, da die Umsetzung von L-Arabinat durch die gereinigt XAD nicht nachgewiesen werden konnte.

Für die Umsetzung von D-Xylose und L-Arabinose wurde die Beteiligung einer Lactonase diskutiert, kodiert von HVO_B0030. Dieser offene Leserahmen befindet sich innerhalb des Genclusters der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus (Abbildung 4). Bisher wurden jedoch keine Untersuchungen zur funktionellen Beteiligung der hypothetischen Lactonase am Abbau der Pentosen durchgeführt (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013). Kürzlich wurde in der Nähe des Genclusters des Pentoseabbaus das Gen HVO_B0040 identifiziert, das für einen hypothetischen Transkriptionsregulator der IclR-Proteinfamilie kodiert. Erste Versuche zeigten eine transkriptionelle Induktion von HVO_B0040 beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose. Des Weiteren wuchs eine Deletionsmutante von HVO_B0040 nicht auf D-Xylose und L-Arabinose, was für eine essentielle Beteiligung von HVO_B0040 am Pentosekatabolismus spricht. Deshalb wurde das Protein, das von HVO_B0040 kodiert wird, XacR (D-xylose and L-arabinose catabolism regulator) genannt (AG Schönheit).



Abbildung 4 Genomumgebung der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013). Die offenen Leserahmen (ORFs) HVO_B0027, HVO_B0028, HVO_B0030, HVO_B0032, HVO_B0038A, HVO_B0039 und HVO_B0040 sind als Pfeile dargestellt und kodieren für die 2-Keto-3-Deoxy-D-Xylonat-Dehydratase (KDXD), D-Xylose-Dehydrogenase (XDH), eine putative Lactonase, L-Arabinose-Dehydrogenase (AraDH), D-Xylonat-Dehydratase (XAD), α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH) und den Transkriptionsregulator XacR. Die ORFs der hypothetischen Lactonase und des Transkriptionsregulators sind schwarz markiert. Der Maßstab weist eine Länge von 1000 bp auf.

Im Gegensatz zu *H. volcanii* konnte für *Haloarcula marismortui* das Wachstum neben D-Xylose auch auf D-Ribose gezeigt werden. Der initiale Schritt des Abbaus dieser Pentosen wird von einer bifunktionellen D-Xylose-/ D-Ribose-Dehydrogenase katalysiert (Johnsen and Schönheit 2004; AG Schönheit). Dies deutet auf einen oxidativen Pentoseabbauweg hin, wie in *H. volcanii*. Allerdings ist die weitere Umsetzung zu α -Ketoglutarat noch ungeklärt. So wurden die kodierenden Gene weiterer am Pentoseabbau beteiligter Enzyme bisher noch nicht identifiziert und die kodierten Enzyme charakterisiert.

Der D-Xyloseabbau ist in dem Haloarchaeon *Halorhabdus utahensis* bisher nicht untersucht, allerdings haben Genomuntersuchungen ergeben, dass das Genom von *H. utahensis* für eine D-Xylose-Isomerase und eine D-Xylulose-Kinase kodiert. Dies deutet darauf hin, dass *H. utahensis* D-Xylose klassisch, wie die meisten Bacteria, zu D-Xylulose-5-Phosphat umwandelt (Anderson et al. 2011). Ein biochemischer Nachweis des D-Xyloseabbaus steht allerdings noch aus.

Ausgehend von den beschriebenen Sachverhalten zum Abbau von Pentosen in Haloarchaea sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Themen bearbeitet werden:

1. Es sollte geprüft werden, ob die hypothetische Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii* funktionell beteiligt ist. Dazu sollte zunächst HVO_B0030 auf eine pentosespezifische Transkription hin untersucht werden. Anschließend sollte mittels HPLC geklärt werden, ob die ersten Dehydrogenasen des Pentoseabbaus, die D-Xylose-Dehydrogenase und die L-Arabinose-Dehydrogease, die Umsetzung von D-Xylose und L-Arabinose zu den entsprechenden Lactonen oder Säuren katalysieren. Weiterhin sollte die rekombinante Lactonase biochemisch charakterisiert werden. Es sollte eine Deletionsmutante der Lactonase hergestellt und das Wachstum analysiert werden.
2. Die transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* sollte mittels Northern Blot und RT-PCR untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob der Transkriptionsregulator XacR an der transkriptionellen Regulation der Gene des Pentoseabbaus beteiligt ist. Abschließend sollte geklärt werden, ob XacR einen Einfluss auf seine eigene Synthese hat.
3. Der erste Schritt des postulierten D-Xylose- und D-Riboseabbaus wird in *H. marismortui* von einer bifunktionellen D-Xylose/ D-Ribose-Dehydrogenase katalysiert. In Zellextrakten sollte die Umsetzung von D-Xylonat beziehungsweise D-Ribonat zu α -Ketoglutarat gezeigt werden. Die daran beteiligten Enzyme, D-Xylonat-Dehydratase, D-Ribonat-Dehydratase und α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase sollten nativ gereinigt und die kodierenden Gene identifiziert werden. Anschließend sollten die rekombinanten Enzyme charakterisiert werden.
4. Das Wachstum von *H. utahensis* sollte auf D-Xylose gezeigt werden. Danach sollten in Extrakten dieser Zellen die Enzymaktivitäten der D-Xylose-Isomerase und der D-Xylulose-Kinase nachgewiesen werden, die auf Grund von Genomanalysen postuliert wurden. Abschließend sollte die putative D-Xylose-Isomerase, kodiert von Huta_2443, überexprimiert, gereinigt und charakterisiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Wachstum

Das Wachstum der *H. volcanii* Stämme (Tabelle 1) und *H. utahensis* erfolgte in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 10 bis 20 ml Medium und wurde über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm im Einstrahl Photometer Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 (GE Healthcare) gegen unbeimpftes Medium verfolgt. Die Proben waren entsprechend dem Proportionalitätsbereich der Zellzahl/Zellstreuungs-Relation des Photometers unter eine OD₆₀₀ von 0,5 zu verdünnen. Das Wachstum von *H. volcanii* erfolgte aerob in einem Heißluftschüttler (INFORS HT, Hamburg) bei 42 °C und 150 rpm. Das Wachstum von *H. utahensis* erfolgte aerob bei 37 °C auf einem Reziprokschüttler (INFORS HT, Hamburg).

Tabelle 1 Verwendete *H. volcanii* Stämme.

<i>H. volcanii</i> Stämme	Genotyp	Referenz
H26	$\Delta pyrE2$	(Bitan-Banin et al. 2003)
H26 ΔHVO_B0030	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_B0030$	diese Arbeit
H26 ΔHVO_B0040	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_B0040$	(AG Schönheit)
H1209	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB \Delta mrr pitA_{Nph}$	(Allers et al. 2010)
H555	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH$	(T. Allers, unveröffentlicht)
H555 ΔHVO_B0040	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH \Delta HVO_B0040$	diese Arbeit

4.1.1 Wachstum von *Haloferax volcanii*

Die Anzucht von *H. volcanii* H26 (Bitan-Banin et al. 2003) und H555 (T. Allers unveröffentlicht) erfolgte in Deletions- oder Synthetikmedium (Tabelle 2 modifiziert nach Dambeck and Soppa 2008). Aufgrund der Deletion des für die Pyrimidin-Synthese essentiellen Enzyms Orotat-phosphoribosyl-Transferase ($\Delta pyrE2$) in den Stämmen H26 und H555, wurde dem Medium für die Anzucht von Stämmen, die kein zusätzliches Plasmid aufwiesen, Uracil in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Wachstumsversuche wurden in Synthetikmedium durchgeführt. Als Kohlenstoffquellen wurden dem Medium D-Glucose, D-Xylose, L-Arabinose in Endkonzentrationen von 5 – 25 mM oder 0,2 – 1 % Casaminosäuren zugesetzt. Die Kulturen wurden mit einer logarithmisch wachsenden, auf D-Glucose oder Casaminosäuren adaptierten Vorkultur auf eine ΔOD_{600} von 0,05 – 0,2 angeimpft.

Die Überexpression von halophilen Proteinen erfolgte im Stamm *H. volcanii* H1209 mit Hilfe des Plasmids pTA963 (Allers et al. 2010). Auf Grund der deletierten Gene der Orotat-phosphoribosyl-Transferase ($\Delta pyrE2$) und der Dihydrofolat-Reduktase ($\Delta hdrB$) erfolgte die Anzucht des Stammes H1209 ohne Plasmid in Gegenwart von 50 $\mu\text{g/ml}$ Uracil und 4 $\mu\text{g/ml}$ Thymidin. Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml DM-YPC Medium (Tabelle 2). Zur Expression wurden 400 ml DM-YPC Medium in zwei 2 l Erlenmeyerkolben mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von etwa 0,1 angeimpft. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD_{600} von etwa 0,6 durch Zugabe von final 2 mM L-Tryptophan (400 mM L-Tryptophan in 0,5 M HCl). Nach etwa 16 h Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 8000 rpm, 12 °C) geerntet (Zentrifuge AvantiTM J-25, Rotor JLA 10.500, Beckman). Die Pellets wurden bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2 Deletions-, Synthetik- und DM-YPC-Medium für *H. volcanii*.

Salzlösung		Zusammensetzung des Deletionsmediums	
NaCl	125 g	Salzlösung pH 7,5	900 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	45 g	Spurenelementlösung	1 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g	FeSO ₄ Stammlösung	1 ml
KCl	10 g	10 % Casamino-säuren	100 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,34 g		
1 M Tris-HCl, pH 7,2 oder 7,5	50 ml		
Einstellen des pH-Wertes auf 7,2 oder 7,5 ad 900 ml mit H ₂ O _{dest.} und autoklavieren.			
Spurenelementlösung		Zusammensetzung des Synthetikmediums	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	Salzlösung pH 7,2	900 ml
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g	1 M K ₂ HPO ₄	1 ml
H ₃ BO ₃	0,3 g	1 M NH ₄ Cl	10 ml
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g	2 M MOPS-KOH pH 7,2	50 ml
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g	Spurenelementlösung	1 ml
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g	FeSO ₄ Stammlösung	1 ml
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g	10 % Hefeextrakt	1 ml
Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 3-4 ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.} und steril filtrieren.			
FeSO₄ Stammlösung		Zusammensetzung des DM-YPC Mediums	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,23 g	Salzlösung pH 7,5	900 ml
Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 3-4 ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.} und steril filtrieren.		10 % Hefeextrakt	50 ml
		10 % Bactopepton	10 ml
		10 % Casamino-säuren (Trp-frei)	10 ml
		Spurenelementlösung	1 ml
		FeSO ₄ Stammlösung	1 ml

4.1.2 Wachstum von *Halorhabdus utahensis*

Der Stamm *Halorhabdus utahensis* (DSM 12940) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die Anzucht von *H. utahensis* erfolgte in 20 ml *H. utahensis* Medium (Tabelle 3) mit 200 µl 10 % Hefeextrakt (final 0,1 %). Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium D-Xylose in einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt. Die Kulturen wurden mit einer logarithmisch wachsenden, auf D-Xylose adaptierten Vorkultur auf eine ΔOD_{600} von 0,15 angeimpft.

Tabelle 3 *Halorhabdus utahensis* Medium 927 (DSMZ, modifiziert).

Salzlösung		CaCl ₂ Stammlösung	
NaCl	270 g	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	100 g
NaBr	0,1 g	ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} und steril filtrieren.	
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	20 g		
KCl	5 g	FeCl₂/MnCl₂ Stammlösung	
NH ₄ Cl	2 g	FeCl ₂ x 4 H ₂ O	20 g
MOPS	20,93 g	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	20 g
Einstellen des pH-Wertes mit KOH auf 7,2 ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} und autoklavieren.		ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} und steril filtrieren.	
KH ₂ PO ₄ Stammlösung		Zusammensetzung des Mediums	
KH ₂ PO ₄	50 g	Salzlösung	1000 ml
ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} und steril filtrieren.		KH ₂ PO ₄ Stammlösung	2,5 ml
		CaCl ₂ Stammlösung	0,5 ml
		FeCl ₂ /MnCl ₂ Stammlösung	0,25 ml

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolierung von DNA

Isolierung von genomischer DNA. Die genomische DNA aus *H. volcanii* und *H. utahensis* wurde mit Hilfe des Kits „Wizard Genomic DNA Purification“ (Promega) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die genomische DNA aus *H. marismortui* wurde mir freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Schönheit zur Verfügung gestellt.

Isolierung von Plasmidvektoren. Die Vermehrung von Plasmidvektoren erfolgte in *E. coli* Stamm XL1-Blue MRF' (Agilent Technologies, Waldbronn) in 100 ml Erlenmyerkolben mit 20 ml LB-Medium und 100 µg/ml Carbenicillin über Nacht unter aeroben Bedingungen bei 37°C. Anschließend wurden die Plasmide aus 4 ml Kultur mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

4.2.2 Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA

Reinigung von DNA. Amplifizierte PCR-Produkte und restriktionsverdaute DNA wurden mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) beziehungsweise nach präparativer Gelelektrophorese mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Konzentrationsbestimmung von DNA. Die Konzentration von DNA wurde mittels Absorptionsmessung am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Inc.; Wilmington, USA) bei 260 und 280 nm bestimmt. Durch die Software ND-1000 wurde die Konzentration ermittelt. Zusätzlich wurde der Absorptionsquotient 260 nm/280 nm gemessen, der Aufschluss über die Reinheit von Nukleinsäuren gibt. Reine DNA weist einen Quotienten von 1,8 auf (Sambrook et al. 1989).

Agarosegelelektrophorese. Die Agarosegelelektrophorese wurde genutzt, um PCR-Produkte, genomische DNA und Plasmide analytisch oder präparativ zu trennen. Die Trennung erfolgte dabei für hochmolekulare DNA in 1 %igen und für niedermolekulare DNA in 2 %igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose entsprechend der gewünschten Konzentration für analytische Gele in 30 ml oder für präparative Gele in 50 ml 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8, mit 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurden 1,5 µl beziehungsweise 2,5 µl 1 %iges Ethidiumbromid hinzugegeben und die Agarose-Lösung in eine Gießvorrichtung (7 x 10 cm) gegossen (Biometra). Die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (Fermentas) versetzt und

neben einem Standard (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder oder Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel für 45 min bei 120 V in TBE-Puffer. Die DNA wurde durch Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert.

4.2.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation von offenen Leserahmen (ORFs) aus genomischer DNA, zur Überprüfung eines Inserts in Transformanten, zur Herstellung von Sonden und zum Nachweis von Transkripten verwendet. Ein Standard PCR Ansatz hatte ein Volumen von 25 – 50 µl, die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Die Temperaturen und Inkubationszeiten der Denaturierungs- und Annealingsschritte variierten abhängig von den Schmelztemperaturen der Oligonukleotid-Primer (Tabelle 4) und der Länge der zu amplifizierenden Produkte. Die bei den Ansätzen verwendeten Enzyme und Chemikalien stammten von PeqLab und Fermentas.

Amplifikation von ORFs und Promotorfragmenten mittels *Pwo*-Polymerase. Die Reaktionsansätze zur Amplifikation von ORFs zur Überexpression und Komplementation bestanden aus etwa 300 ng genomischer DNA der entsprechenden Organismen als Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 200 µM dNTP Mix, 2 mM MgSO₄, 1x Reaktionspuffer (incomplete) und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Mit Hilfe von mismatch-Primern wurden Schnittstellen eingefügt, die zur späteren Klonierung verwendet wurden. Die Programme für die einzelnen PCR Ansätze bestanden in der Regel aus 2 min initialer Denaturierung bei 94 °C, gefolgt von 10 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 48 – 62 °C und 90 s Synthese bei 68 °C. Nach weiteren 25 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 52 – 66 °C und 90 s Synthese bei 68 °C, folgte die abschließende Polymerisation für 7 min bei 68 °C.

Die Reaktionsansätze zur Amplifikation von Promotorfragmenten zur Promotoranalyse bestanden aus etwa 500 ng genomischer DNA aus *H. volcanii* als Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 200 µM dNTP Mix, 2 mM MgSO₄, 1x Reaktionspuffer (incomplete) und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die Programme für die einzelnen PCR Ansätze bestanden in der Regel aus 2 min initialer Denaturierung bei 94 °C, gefolgt von 10 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 49 – 56 °C und 45 s Synthese bei 68 °C. Nach weiteren 25 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s

Annealing bei 55 – 62 °C und 45 s Synthese bei 68 °C, folgte die abschließende Polymerisation für 7 min bei 68 °C.

Überprüfung von Transformanten und Deletionsmutanten mittels *Taq*-Polymerase.

Transformierte *E. coli* Zellen wurden mit Hilfe einer Kolonie-PCR auf ein erfolgreich in das Plasmid inseriertes DNA-Fragment der erwarteten Länge hin überprüft. Zur Amplifikation des inserierten Gens wurden unterschiedliche Primerpaare verwendet (Tabelle 4), für die Plasmide pTA963 (pTA963_p.tnaA_s und T3), pTA919 (bgaHas+126 und T7 Promotor) und pDrive (T7 Promotor und M13 uni (-21)). Der 25 µl Reaktionsansatz jeder PCR enthielt eine mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommene Kolonie als Template, je 200 nM forward und reverse Primer, 1x Reaktionspuffer Y, 1x Enhancer Solution P, 200 µM dNTP-Mix und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Zur Vermeidung eines Aktivitätsverlustes der *Taq*-DNA-Polymerase wurde diese nach dem initialen Denaturierungsschritt (95 °C, 4,5 min) zugegeben. Darauf folgten 30 Zyklen, die jeweils aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 48 °C für 30 s und Synthese bei 72 °C für 30 – 90 s bestanden. Es erfolgte eine abschließende Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

Um zwischen dem Wildtyp von *H. volcanii* und erfolgreicher Deletion zu unterscheiden, wurden zwischen der ersten und dritten Passage pop-out PCRs durchgeführt. Von jedem zu untersuchenden Klon wurde ein Aliquot von 100 µl bei 13200 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Abnahme des Überstandes in 100 µl H₂O_{dest.} lysiert. Jeder 25 µl Reaktionsansatz enthielt 5 µl lysierter Zellen als Template, 200 nM forward und reverse Primer (frg1s und frg2as Primer, Tabelle 4), 1x Reaktionspuffer Y, 1x Enhancer, 200 µM dNTP Mix und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das Programm enthielt einen initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 4,5 min, 30 – 40 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 58 – 68 °C und einer Synthese bei 72 °C von 90 s, die nach jedem Zyklus um 20 s verlängert wurde. Es erfolgte eine abschließende Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

Tabelle 4 Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Schnittstellen für Restriktionsenzyme (RE) und mutierte Basen sind unterstrichen, K. PCR = Kolonie PCR, SB = Southern Blot, NB = Northern Blot, ÜE = Überexpression, Komp = Komplementation. TSSbest. = Transkriptionsstartbestimmung.

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Verwendung	RE
pTA963_p.tnaA_s	TGGCGAGAACGGAACAGC	K. PCR	
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG		
bgaHas+126	GATTCGTCGCCACGCGAAC		
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG		
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT		
HVO_B0030frg1s	AACCCGGTGTACGCCGCGACG	ΔHVO_B0030	
HVO_B0030frg1as	GGAACAGCGGCTTCTCGTCGGGTGCCAGA		
HVO_B0030frg2s	CCGACGAGAAGCCGCTGTTCCGCCTCGACGTGG		
HVO_B0030frg2as	TGGGCTGCTACGCCGTCAGCG		
HVO_B0030son_as	CCGAGTCGGCACGACGTGTCG	SB Sonde (+frg1s)	
HVO_B0030BspHIs	GAACGGTTGCT <u>CATG</u> ACCGTC	ÜE, Komp	<i>Bsp</i> HI
HVO_B0030BamHIas	GAGGGAT <u>CCG</u> TGTCGGTCATG		<i>Bam</i> HI
HVO_B0040frg1s	GGCCGGAAACTGAACGATGGG	SB Sonde	
HVO_B0040son_as	CACCACTGTCCGTCCCTCG		
RibL10-RT_F	ACAGCACAATATGGGCGACCTGC	RT-PCR	
RibL10-RT_R	GTCCTCGACGTCGCAGTAGATGG		
RibL10_F	CCTGAAGGTCGAAGAGGAAGTGC		
RibL10_R	GCGGGAACCTTGCGCAGAATCATC		
HVO_B0040RTs	CTCGTCGAGGAGTTGATGCAG		
HVO_B0040RTas	CCTTTCGCTCGCATCAGGTAG		
HVO_B0038ARTs	GAAGTTCGGCCAGCGGACGCTGC		
HVO_B0038ARTas	GTCCGCGAGGTCGGCAATCTTCC		
HVO_B0030NBs	CCCGACGAGAAGCGGCTGTAC	NB Sonden	
HVO_B0030NBas	TGCTCTCGTCGCCCTCGCCAG		
HVO_B0032NBs	CGTCTACGAGGCGGCGCTGGC		
HVO_B0032NBas	CGCCGAGTTGTCTCGCGGGCG		
HVO_B0027NBs	TCGGCCCGTGTGTGGTGACGC		
HVO_B0027NBas	CTCGACGATGTCGGTGGGGGC		
HVO_B0039NBs	GAGACGACCGAGGTGACGAAC		
HVO_B0039NBas	GCGGCCTTCGACGAGAAGTAG		

Tabelle 4 Fortsetzung Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	Verwendung	RE
HVO_B0038As-162	TTACTAG <u>GGGCCC</u> GTCATCGG	Promotor-	<i>ApaI</i>
HVO_B0038As-54	GCGTC <u>GGGCCC</u> AGTGACG	Analysen	<i>ApaI</i>
HVO_B0038As-47	GATCTT <u>GGGCCC</u> GACTACCGACCCACAC		<i>ApaI</i>
HVO_B0038As-42	GATCTT <u>GGGCCCC</u> CGACCCACACACTTT		<i>ApaI</i>
HVO_B0038As-38	GGACTAC <u>GGGCCC</u> ACACAC		<i>ApaI</i>
HVO_B0038As-31	GATCTT <u>GGGCCC</u> ACTTTTGTAGTGGCTTTC		<i>ApaI</i>
HVO_B0038As-15	CTTTTGTAG <u>GGGCC</u> CTCGAG		<i>ApaI</i>
HVO_B0038ANdeIas	GTCGCGC <u>CATATG</u> GTACTCCG		<i>NdeI</i>
HVO_B0040s-60	GATCTT <u>GGGCC</u> CTTCACAGCGCCTCGTTC		<i>ApaI</i>
HVO_B0040NdeIas	ACGAGCGC <u>CATATG</u> CTTTTCCGTGG		<i>NdeI</i>
HVO_B0038A_NESs	CCGCGTTCGGGTCGCTAAGC	TSSbest.	
HVO_B0038A_NESas	CGCCCGACCTGCCCCGC		
HVO_B0040M1s	CTTATTCAGATACTTGATAAC <u>GGCTCCGA</u> ATGG ACGCCAAACATCCGGTAC	Mutagenese	
HVO_B0040M1as	GTACCGGATGTTTGGCGTCCAT <u>TCCGAGCC</u> GTTA TCAAGTATCTGAATAAG		
HVO_B0040M2s	CCGACCAGAACACTTATTCAC <u>GGCCCG</u> GATAAC GAATAATCATGGACGCC		
HVO_B0040M2as	GGCGTCCATGATTATTCGTTATC <u>GCGGCC</u> GTGAA TAAGTGTCTGGTCGG		
HVO_B0032NcoIs	GTCATCC <u>CATGGC</u> ACGTATTGCG	ÜE	<i>NcoI</i>
HVO_B0032BamHIas	TCAGCCAC <u>GGATCC</u> GCTCGCTCAC		<i>BamHI</i>
HVO_B0028BspHIs	GTCACCACCT <u>CATGAG</u> CCCCGC		<i>BspHI</i>
HVO_B0028BamHIas	ATGCGG <u>GGATCC</u> GCGGGAAACC		<i>BamHI</i>
rrnAC0575NcoIs	CAAGCGGGG <u>CCATGG</u> GAAAGGC		<i>NcoI</i>
rrnAC0575BamHIas	ACGATGGGGGT <u>GGATCC</u> TTACGC		<i>BamHI</i>
rrnAC3032PciIs	TATGTCCGGC <u>ACATGT</u> CGCCAAC		<i>PciI</i>
rrnAC3032BamHIas	TCTATGAC <u>GGATCC</u> GTACGCAGC		<i>BamHI</i>
rrnAC3036BspHIs	GAATTAACT <u>CATGAC</u> GCAGACG		<i>BspHI</i>
rrnAC3036BamHIas	CTGTAACAAGGATCCACTTCACG		<i>BamHI</i>
Huta_2443BspHIs	GTGATAT <u>CATGAG</u> CGAATACTTCC		<i>BspHI</i>
Huta_2443BamHIas	AGGTGGAGG <u>GATCCT</u> CACTGC		<i>BamHI</i>

4.2.4 Standard Klonierung

Restriktionshydrolyse. Der Verdau von PCR-Produkten, Plasmiden und genomischer DNA erfolgte in 50 µl Ansätzen für 12 h mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs GmbH) im Einzel- oder Doppelverdau. Der Puffer und die Temperatur wurden nach Angaben des Herstellers gewählt.

Ligation. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 20 µl. Der Ligationsansatz enthielt das restriktionsverdaute Plasmid, restriktionsverdautes PCR-Produkt, 1 – 5 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) sowie den T4-DNA-Ligase Puffer. Die zu ligierenden PCR-Produkte wurden in der Regel in einem dreifachen molaren Überschuss zu den Plasmiden eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 – 2 h bei 22°C inkubiert und anschließend die Ligase für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert.

Transformation eines Plasmides in *E. coli*. Es wurden 40 µl elektrokompente *E. coli* Zellen (Stamm XL1-Blue MRF') auf Eis aufgetaut und mit 1 – 2 µl Plasmid oder Ligationsansatz in eisgekühlten Küvetten vermischt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 12,5 kV/cm, 25 µF und 200 Ω. Nach Zugabe von 700 µl SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCL, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose) wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und 800 rpm auf einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf oder Thermoshaker TSC, Biometra) inkubiert und anschließend ausplattiert. Dazu wurden Aliquots auf LB-Agarplatten (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid, pH 7,5 mit 15 g/l Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten enthielten 100 µg/ml Carbenicillin zur Selektion des Plasmids.

Sequenzierung. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide (Tabelle 5) wurden sequenziert, um das Insert und die flankierenden Bereiche auf Fehlerfreiheit zu überprüfen. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG (MWG, Ebersberg) durchgeführt. Mit Hilfe von ClustalW2 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) konnten die Sequenzen mit den Originalsequenzen (Halolex: www.halolex.mpg.de/public/) abgeglichen und auf Fehlerfreiheit überprüft werden.

Tabelle 5 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. RE = verwendete Restriktionsenzyme, ÜE = Überexpression, Komp = Komplementation, M1 und M2 = Mutationen.

Bezeichnung	Beschreibung, Verwendung	RE	Referenz
pTA131	suicide Vektor basierend auf pBluescript mit <i>pyrE2</i>		(Allers et al. 2004)
pTA131-ΔHVO_B0030	Deletion der XANL in H26	<i>EcoRV</i>	diese Arbeit *
pTA131-ΔHVO_B0040	Deletion von HVO_B0040 in H555	<i>EcoRV</i>	(AG Schönheit)
pTA963	episomaler haloarchaeeller Expressionsvektor mit 6x His-Tag, <i>pyrE2</i> und <i>hdrB</i>		(Allers et al. 2010)
pTA963-HVO_B0030	ÜE der XANL in H1209, Komp in H26 ΔHVO_B0030	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit *
pTA963-HVO_B0040	Komp in H26 ΔHVO_B0040	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	(AG Schönheit)
pTA963-HVO_B0032	ÜE der AraDH in H1209	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pTA963-HVO_B0028	ÜE der XDH in H1209	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pTA963-Huta_2443	ÜE der D-Xylose-Isomerase in H1209	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit *
pTA963-rrnAC0575	ÜE der XAD in H1209	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit *
pTA963-rrnAC3032	ÜE der RAD in H1209	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit *
pTA963-rrnAC3036	ÜE der KGSADH in H1209	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	diese Arbeit
pTA919	episomaler haloarchaeeller Vektor für Promotoranalysen, <i>pyrE2</i> und <i>bgaH</i>		(AG T. Allers)
pUJ28-162	p.HVO_B0038A-162+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ28-54	p.HVO_B0038A-54+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ28-47	p.HVO_B0038A-47+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ28-42	p.HVO_B0038A-42+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ28-38	p.HVO_B0038A-38+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ28-31	p.HVO_B0038A-31+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit

* Die Konstruktion der Plasmide wurde im Rahmen von Laborpraktika oder Bachelorarbeiten betreut.

Tabelle 5 Fortsetzung Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung, Verwendung	RE	Referenz
pUJ28-15	p.HVO_B0038A-15+42::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ30-60	p.HVO_B0040-60+36::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ30-60 M1	p.HVO_B0040-60+36M1::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit
pUJ30-60 M2	p.HVO_B0040-60+36M2::bgaH in pTA919	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	diese Arbeit

4.2.5 Transformation eines Plasmides in *H. volcanii*.

Für die Transformation von *H. volcanii* (Cline et al. 1989) wurden 2 ml Kultur 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig entfernt, das Pellet in 162 µl Sphäroblastenbildungslösung (SBL: 50 mM Tris-HCl, pH 8,2, 800 mM NaCl, 27 mM KCl, 15 % Saccharose) + 18 µl EDTA-Lösung (0,5 M EDTA, pH 8,2) resuspendiert und die Sphäroblastenbildung mikroskopisch kontrolliert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl DNA-Lösung (2 – 5 µg Plasmid-DNA in 0,8 M NaCl) und das 20-malige vorsichtige Invertieren des Eppendorf Reaktionsgefäßes. Nach einer Inkubation von 5 min bei 20 °C wurden 210 µl PEG-Lösung (60 % PEG 600, 40 % SBL) in den Deckel des Eppendorfgefäßes gegeben und die Lösungen durch rasches Schwenken miteinander vermischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mikroskopisch auf Aggregatbildung kontrolliert. Anschließend wurden 1800 µl Sphäroblastenverdünnungslösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 3,4 M NaCl, 175 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 34 mM KCL, 5 mM CaCl₂, 15 % Saccharose) hinzugegeben und gründlich gemischt. Abschließend wurden geeignete Verdünnungen auf Deletionsmedium-Agarplatten (Deletionsmedium (Tabelle 2) mit 1,5 g Agarose pro 100 ml Salzlösung) ausplattiert. Die Platten wurden bis zu 10 Tage bei 42 °C inkubiert, bis einzelne Kolonien unter dem Binokular zu erkennen waren.

4.2.6 Deletion und Komplementation in *H. volcanii*

Deletion. Die *H. volcanii* Deletionsmutanten H26 Δ HVO_B0030 und H555 Δ HVO_B0040 wurden über die sogenannte pop-in/pop-out Methode mit Hilfe des Plasmides pTA131 generiert (Allers et al. 2004; Bitan-Banin et al. 2003). Dabei wurde jeweils ein Plasmid, welches für das deletierte Gen mit flankierenden 5'- und 3'-Bereichen kodiert, über homologe Rekombination ins Genom von *H. volcanii* integriert und anschließend auf den Verlust des zuvor integrierten Vektors selektiert.

H. volcanii H26 (Δ pyrE2) ist ein Uracil-auxotropher Stamm, der nur in Gegenwart von Uracil wachsen kann. Das Plasmid pTA131 besitzt ein funktionelles *pyrE2* Gen, welches unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht und für die in der Uracilbiosynthese benötigte Orotat-Phosphoribosyltransferase kodiert. Nach der Transformation von *H. volcanii* mit dem Plasmid wird in Uracil-freiem Deletionsmedium (Tabelle 2) auf Transformanten selektiert, die durch homologe Rekombination das Plasmid integriert haben (pop-in). Die Integration des Plasmides führt zu Stämmen, die neben der Wildtypkopie des Gens auch die Deletionsvariante des Gens enthalten. Nach zehnmalem Überimpfen in Uracil-freiem Medium mit je 2,5 % Inokulum wurden die Transformanten auf eine Agarplatte mit Deletionsmedium, 30 μ g/ml Uracil und 50 μ g/ml 5-Fluororotsäure (5-FOA) ausplattiert. Alle Zellen mit dem integrierten Plasmid, die das *pyrE2* Gen enthalten, wandeln 5-FOA in das toxische 5-Fluorouracil um und werden abgetötet. Durch diese Selektion können nur Zellen wachsen, die das Plasmid durch ein zweites Rekombinationsereignis verloren haben. (pop-out). Abhängig davon, an welcher Stelle das zweite Rekombinationsereignis erfolgt ist, enthält deren Genom nun entweder das ursprüngliche Wildtypgen oder die Deletionsvariante. Durch eine pop-out PCR (4.2.3) wurden Klone mit einer Deletion des jeweiligen Gens identifiziert, diese wurden dann in Deletionsmedium mit 30 μ g/ml Uracil und 50 μ g/ml 5-FOA zehnmal mit je 2,5 % Inokulum überimpft. Der spezifische Nachweis auf eine erfolgreiche Deletion des Zielgens erfolgt mittels Southern Blot.

Komplementation. Die *H. volcanii* H26 Deletionsmutanten, die nicht mehr oder nur noch vermindert dazu in der Lage waren auf bestimmten C-Quellen zu wachsen, wurden mit dem Plasmid pTA963 transformiert. Die Plasmide kodierten für das jeweilige funktionelle Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Die Induktion der Expression erfolgte durch bis zu 100 μ M L-Tryptophan in Synthetikmedium (Tabelle 2), anschließend wurde das Wachstum am Photometer verfolgt (4.1.1).

Southern Blot. Der spezifische Nachweis von deletierten Genen erfolgte mittels Southern Blot, dazu wurde die genomische DNA aus den „Pop-in“- und „Pop-out“-Konstrukten und zum Vergleich aus dem Wildtyp isoliert (4.2.1). Die DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (4.2.4), für H26 Δ HVO_B0030 mit *NotI* und für H555 Δ HVO_B0040 mit *EcoRV*. Die entstandenen Fragmente wurden in einem 1 %igen Agarosegel für 95 – 120 min bei konstanten 100 V aufgetrennt (4.2.2). Neben einem Standard (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas) und jeweils 1 μ g der verdauten genomischen DNA wurde auch ein DIG-markierter Größenstandard (DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin-labeled, Roche) aufgetragen. Die DNA wurde mittels Vakuum (Vacu-Blot, Biometra) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) übertragen. Dafür wurde das Gel 25 min mit Depurinationslösung (250 mM HCl), 20 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 25 min mit Neutralisationslösung (0,5 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,5) bei einem Unterdruck von -60 mbar und 40 min mit 20x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7,0) bei einem Unterdruck von -80 mbar geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Fixierung der DNA (Cross-Linking) für 90 s unter UVA-Licht ($\lambda = 312$ nm) inkubiert. Danach wurde die Membran in DIG Easy Hyb (Roche) bei 50 °C für 30 min inkubiert. 150 – 200 ng der mit Digoxigenin markierten Sonde (4.2.6) wurden für 7 min bei 99 °C denaturiert und über Nacht bei 50 °C mit der Membran in 10 ml DIG Easy Hyb inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 15 min mit 50 ml Low Stringency Buffer (2x SSC mit 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und zweimal für 15 min mit 50 ml High Stringency Buffer (0,5x SSC mit 0,1 % SDS) bei 68 °C inkubiert. Die anschließende Detektion wurde mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anhand des spezifischen Bandenmusters konnte über Fragmentgrößenanalyse auf erfolgreiche Deletion in den jeweiligen Deletionsmutanten geschlossen werden.

Herstellung von DNA Sonden. Die Herstellung der Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Southern Blot erfolgte mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben. Ein 50 μ l Reaktionsansatz enthielt 100 pg Plasmid-DNA als Template, je 500 nM forward und reverse Primer (...frg1s und ...son_as, Tabelle 4), 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5x „PCR DIG Probe Synthesis Mix“, 0,5x „dNTP stock solution“ und 1,75 U Enzym-Mix. Die Programme für die einzelnen PCR Ansätze bestanden in der Regel aus 2 min initialer Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 35 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 58 – 68 °C und 45 – 60 s Synthese bei 68 °C. Abschließend folgte eine Polymerisation für 7 min bei 68 °C.

4.2.7 Transkriptnachweis mittels Northern Blot und RT-PCR

Der Nachweis von Transkripten (mRNA) erfolgte mittels RT-PCR oder Northern Blot. Bei Arbeiten mit RNA wurden alle verwendeten Lösungen mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht bei 37 °C auf einem Reziproschüttler inkubiert und anschließend autoklaviert. Alle Glaswaren wurden für 4 h bei 240 °C gebacken, Spitzen und Reaktionsgefäße wurden zweimal autoklaviert. Der Labortisch und die Pipetten wurden vor dem Arbeiten mit 1 mM EDTA und 100 mM NaOH behandelt.

Isolierung, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von RNA. Die Isolierung von RNA erfolgte aus 2 – 6 ml einer exponentiell (Transkriptnachweis) oder stationär (Induktionsversuche) wachsenden *H. volcanii* Kultur ($OD_{600} = 1 - 1,5$). Die Zellen wurden für 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, anschließend wurde das Pellet in 1 ml TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich) aufgenommen und die Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte analog zur DNA (4.2.2). Reine RNA weist einen 260 nm/280 nm Quotienten von 2 auf (Sambrook et al. 1989).

Northern Blot. Die RNA wurde in 1,2 %igen Formaldehydgelen getrennt, dazu wurde die Agarose in 50 ml MOPS-Puffer (20 mM MOPS, pH 7, 5 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurden 2,5 µl 0,01 %iges Ethidiumbromid und 900 µl 37 %iges Formaldehyd hinzugegeben und die Agarose-Lösung in eine Gießvorrichtung (7 x 10 cm) gegossen (Biometra). Nach dem Aushärten wurde das Gel für 30 min in FA-Laufpuffer (MOPS-Puffer mit 0,74 % Formaldehyd) equilibriert. Die Proben wurden mit 2x Auftragspuffer für RNA (Fermentas) versetzt und neben einem Standard (RiboRuler™ High Range RNA Ladder; Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V in FA-Laufpuffer für 60 min. Die RNA wurde durch Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert.

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die RNA mittels Vakuum (Vacu-Blot; Biometra) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) übertragen. Dafür wurde das Gel zweimal für je 25 min mit $H_2O_{dest.}$ und zweimal für je 30 min mit 20x SSC (3 M NaCl und 300 mM Na-Citrat, pH 7,0) bei einem Unterdruck von -60 mbar und für 40 min mit 20x SSC bei einem Unterdruck von -80 mbar geblottet. Nach kurzer Inkubation der Membran in 2x SSC wurde diese für 30 min bei 120 °C inkubiert. Danach wurde die Membran in DIG Easy Hyb (Roche) bei 50 °C für 30 min inkubiert. Die mit Digoxigenin markierte Sonde (4.2.6, 4.2.7) für die spezifische Detektion des Transkriptes wurde für 7 min bei 99 °C denaturiert und über Nacht bei 50 °C mit der Membran in 10 ml DIG Easy Hyb inkubiert. Danach wurde

die Membran zweimal für 5 min mit Low Stringency Buffer (2x SSC mit 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und zweimal für 5 min mit vorgewärmtem High Stringency Buffer (0,5x SSC mit 0,1 % SDS) bei 50 °C inkubiert. Die anschließende Detektion wurde mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Herstellung von DNA Sonden für Northern Blot. Die Herstellung der Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern Blot erfolgte analog zu den Southern Blot Sonden (4.2.6) mit folgenden Änderungen: Es wurden etwa 50 ng genomischer DNA aus *H. volcanii* als Template eingesetzt und als forward und reverse Primer dienten ...NBs und ...NBas (Tabelle 4).

Nachweis von Transkripten durch Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR). Die Transkripte von HVO_B0038A und HVO_B0040 wurden über RT-PCR nachgewiesen. Dazu wurde die isolierte RNA (4.2.7) mit DNaseI nach Angaben des Herstellers behandelt (Fermentas) und anschließend die RT-PCR mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ein 25 µl Reaktionsansatz enthielt 10 – 50 ng RNA, je 250 nM forward und reverse Primer, 400 µM dNTP Mix, 1x RT-PCR Puffer, 1x Q-Solution und 1 µl Enzym Mix. Als konstitutive Kontrolle wurde das Transkript des *ribL10* Genes benutzt (Brenneis et al. 2007). Für *ribL* wurden die Primer RibL10-RT_F und RibL10-RT_R und für *ribLs* die Primer RibL10_F und RibL10_R verwendet, *ribL* und *ribLs* unterscheiden sich in der Länge des amplifizierten PCR-Produktes. Zu Beginn des Standard RT-PCR Programms wurden die Proben für 30 min bei 50 °C inkubiert (cDNA Synthese). Danach wurde die Reverse Transkriptase für 15 min bei 95 °C inaktiviert. Darauf folgten 23 – 32 Zyklen, die jeweils aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 62 °C für 30 s und Synthese bei 72 °C für 30 s bestanden. Es erfolgte eine abschließende Polymerisation bei 72 °C für 10 min. Um zu prüfen, ob die Ansätze DNA-frei waren, wurden Kontrollansätze gemacht, in denen die RNA erst nach dem Inaktivierungsschritt der Reversen Transkriptase hinzugegeben wurde.

Das Transkript von HVO_B0038A wurde in mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Fragestellungen nachgewiesen. Das Transkript von HVO_B0038A wurde in D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen im Vergleich zu D-Glucose gewachsenen Zellen nachgewiesen (5.1.2.1). Dazu wurden für D-Xylose und D-Glucose gewachsene Zellen 10 ng RNA mit 25 Zyklen für *ribLs* und 23 Zyklen für HVO_B0038A eingesetzt, für L-Arabinose und D-Glucose gewachsene Zellen wurden 20 ng RNA mit 28 Zyklen für *ribL10* und 30 Zyklen für HVO_B0038A eingesetzt. Um den Einfluss von HVO_B0040 auf HVO_B0038A

in *H. volcanii* ΔHVO_B0040 zu zeigen (5.1.2.3), wurden 50 ng RNA mit 32 Zyklen für *ribL10* und 23 – 28 Zyklen für HVO_B0038A eingesetzt. Um das Transkript von HVO_B0040 in dem Komplementationsstamm *H. volcanii* ΔHVO_B0040 pTA963-HVO_B0040 nachzuweisen (5.1.2.3), wurden 50 ng RNA mit 32 Zyklen für *ribL10* und 28 Zyklen für HVO_B0040 eingesetzt.

4.3 Promotoranalysen

4.3.1 Transkriptionsstartbestimmung

Die 5'- und 3'-Enden des D-Xylonat-Dehydratase Transkripts (HVO_B0038A) wurden, wie in Brenneis et al. 2007 beschrieben, mit Hilfe von RNA Zirkularisation, reverser Transkription und Amplifikation bestimmt. Die durch eine T4 RNA Ligase (New England Biolabs) ligierte mRNA aus D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose gewachsenen *H. volcanii* Zellen wurde mir freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Schönheit überlassen. 350 ng der ligierten mRNA wurden mit Hilfe des „One Step RT-PCR Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers für 10 min bei 65 °C revers transkribiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation von PCR-Produkten aus Transkripten von HVO_B0038A, deren 5'- und 3'-Enden ligiert waren. Dazu wurden die Ansätze mit den Primern HVO_B0038ARTs und HVO_B0038ANdeIas (Tabelle 4) 30 min bei 50 °C inkubiert, gefolgt von 35 Zyklen, jeweils bestehend aus 45 s Denaturierung bei 95 °C, 45 s Annealing bei 63 °C und 60 s Synthese bei 72 °C, anschließend erfolgten 10 min Synthese bei 72 °C. 0,5 ng des gereinigten PCR-Produktes wurden als Template für eine „nested“ PCR mit einer *Taq*-Polymerase eingesetzt, die Primer sind in Tabelle 4 angegeben. Das PCR Produkt wurde in das Plasmid pDrive (Qiagen) kloniert und in *E. coli* transformiert. Abschließend wurden insgesamt 30 Klone sequenziert (20 aus mRNA von D-Xylose gewachsenen Zellen und 10 aus mRNA von L-Arabinose gewachsenen Zellen). Die Sequenzen wurden mit den Originalsequenzen (Halolex: www.halolex.mpg.de/public/) abgeglichen und so die Längen der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche des Transkripts identifiziert.

4.3.2 Konstruktion von *bgaH*-Reporterfusionen

Für die Promotoranalysen von HVO_B0038A und HVO_B0040 wurde das Plasmid pTA919 (T. Allers unveröffentlicht) verwendet. Zur Vermehrung und Selektion in *E. coli* weist das Plasmid den ColE1 Origin und ein Gen, das eine Ampicillinresistenz vermittelt, auf. Der pHV2 Origin und das *pyrE2* Gen dienen der Vermehrung und Selektion in einem Uracil auxotrophen *H. volcanii* Stamm. Des Weiteren kodiert das Plasmid für eine β -Galaktosidase, die aus einem mutierten *Haloferax lucentense* (früher *H. alicantei*) Stamm isoliert wurde (Holmes et al. 1997; Holmes and Dyall-Smith 2000). Die β -Galaktosidase wurde als Reporter gen verwendet, dafür besitzt das Plasmid die Restriktionsschnittstellen *ApaI* und *NdeI*, mit deren Hilfe Promotorfragmente vor die β -Galaktosidase kloniert werden können. Die *ApaI* Schnittstelle befindet sich stromaufwärts zur β -Galaktosidase. Die *NdeI*-Schnittstelle (CATATG) befindet sich auf dem Start ATG der β -Galaktosidase und kodiert so mit den letzten drei Basen der Schnittsequenz für die erste Aminosäure der β -Galaktosidase.

Die 5'-Primer zur Amplifikation der Promotorfragmente -31, -42 und -47 von HVO_B0038A (Tabelle 4) wurden so gewählt, dass sie 31 bis 47 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts binden konnten (beziehungsweise für HVO_B0040 60 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (AG Schönheit)) und zusätzlich am 5'-Ende eine *ApaI*-Schnittstelle aufwiesen, gefolgt von sechs zusätzlichen Basen. Die 5'-Primer zur Amplifikation der Promotorfragmente -15, -38, -54 und -162 von HVO_B0038A waren mismatch-Primer, die stromaufwärts des Start ATGs binden konnten und jeweils die Sequenz für eine *ApaI*-Schnittstelle aufwiesen. Für die Amplifikation der unterschiedlich langen Fragmente von HVO_B0038A wurde der gleiche 3'-Primer benutzt (für die Fragmente von HVO_B0040 wurde ein anderer 3'-Primer verwendet (Tabelle 4)). Der 3'-Primer war ein mismatch-Primer und konnte bis 42 bp stromabwärts des Start ATGs von HVO_B0038A binden (für HVO_B0040 36 bp) und wies zusätzlich eine *NdeI*-Schnittstelle auf. Mit Hilfe der Schnittstellen wurden die Promotorfragmente in das Plasmid pTA919 kloniert, so dass das Reporter gen β -Galaktosidase als *in frame* Fusionskonstrukt mit einem Teil der 5'-Sequenz von HVO_B0038A (42 bp) oder HVO_B0040 (36 bp), sowie 3 Basen der *NdeI*-Schnittstelle (CAT), die für ein Histidin kodieren, unter der Kontrolle des jeweiligen Promotorfragmentes stand. Die Plasmide wurden in den Stamm *H. volcanii* H555 transformiert, in dem das *pyrE2* Gen und ein zur β -Galaktosidase aus *H. lucentense* homologes Gen deletiert waren (T. Allers, unveröffentlicht). Die Kulturen wurden auf Synthetikummedium (Tabelle 2) mit 1 % Casaminosäuren, D-Xylose oder L-Arabinose über eine Passage adaptiert, danach wurden

Wachstumskulturen (4.1.1) auf den jeweiligen Substraten angeimpft. Nach ein bis zwei Tagen wurde die Aktivität der β -Galaktosidase in den Kulturen bestimmt (4.6.3).

4.3.3 Ortsspezifische Mutagenese

Die „inverted repeats“ des potentiellen Repressorbindemotives wurden mit Hilfe des „QuickChange Lightning site-directed Mutagenesis Kit“ (Agilent Technologies) nach den Angaben des Herstellers mutiert. Als Template diente das Plasmid pUJ30-60, die Primer sind in Tabelle 4 angegeben.

4.3.4 Messung der β -Galaktosidase

Die β -Galaktosidase hydrolysiert ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) zu D-Galactose und dem gelben Farbstoff o-Nitrophenol (ONP), der mit Hilfe eines beheizbaren Ultrospec 2000 Photometers (GE Healthcare) in einer kontinuierlichen Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden konnte. Dafür wurden 50 beziehungsweise 100 μ l Zellen in 779 beziehungsweise 729 μ l BgaH-Puffer (50 mM Tris, pH 7,2 (bei 30 °C), 2,75 M NaCl, 10 μ M MnCl_2) + 20 μ l 0,1 % SDS + 1 μ l β -Mercaptoethanol gegeben und durch Auf- und Ab-Pipettieren lysiert. Die lysierten Zellen wurden in Plastikkuvetten im Photometer für 15 min auf 30 °C vorgewärmt. Die Reaktion der β -Galaktosidase wurde durch Zugabe von 150 μ l ONPG (6 mg/ml in BgaH-Puffer, vorgewärmt) gestartet und am Schreiber verfolgt. Die spezifische Aktivität konnte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{405} = 3,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und einer OD_{600} – Proteinrelation (eine OD_{600} von 1 entspricht einer Proteinkonzentration von 0,28 mg/ml) errechnet werden (Holmes et al. 1997; Masterarbeit Anne-Christine Schulz, 2014).

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Bestimmung von D-Xylose in Wachstumsüberständen

In Wachstumsüberständen von *H. utahensis* wurde die D-Xylose Konzentrationen colorimetrisch bestimmt (Brückner 1955). Der Testansatz enthielt 100 µl Probe (maximal 1,5 mM D-Xylose im Test), 200 µl H₂O_{dest.} und 900 µl Testreagenz (41,5 ml konz. HCl, 2,5 ml Stammreagenz ad 50 ml H₂O_{dest.}; Stammreagenz: 1,35 g Ammoniumeisen-(III)sulfat, 2 g Orcin ad 50 ml H₂O_{dest.}). Der Testansatz wurde gemischt, für 20 min im Wasserbad gekocht und anschließend für 5 min abgekühlt. Abschließend wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die D-Xylose Konzentrationen in der Probe konnten mit Hilfe einer Eichgeraden errechnet werden, aus der der molare Extinktionskoeffizient für D-Xylose mit $\epsilon = 5,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt wurde.

4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proteinkonzentrationen wurden nach einer modifizierten Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Je 100 µl proteinhaltige Probe (maximal 5 µg im Test) wurde mit 900 µl Bradford-Reagenz (70 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml 99 % Ethanol, 100 ml 80 % ortho-Phosphorsäure ad 1 l H₂O_{dest.}) versetzt und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Messwerte sind gegen die Extinktion einer Probe ohne Protein korrigiert worden. Anhand einer aufgenommenen Eichgerade eines Standards aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck), konnte ein molarer Extinktionskoeffizient ($\epsilon = 0,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und die Konzentration der Proben bestimmt werden. Die Extinktion war der Proteinkonzentration bis zu einer Konzentration von 5 µg im Test proportional.

4.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE diente der Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung und der Größenbestimmung unter denaturierenden Bedingungen. Die Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) erfolgte in 10 oder 12 %igen, diskontinuierlichen Gelen (7 cm x 8 cm x 0,075 cm) in einer Mini Protean 3 Elektrophorese Zelle (Bio-Rad). Die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6 Zusammensetzung der Trenn- /Sammelgele. Trenngele wurden entweder 10 oder 12 %ig verwendet.

	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel (3,33 %)
30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid	1,67 ml	2 ml	0,25 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	0,3 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl
H ₂ O _{dest.}	1,97 ml	1,64 ml	1,63 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Zwei Volumen Probe wurden mit einem Volumen 30 %iger TCA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die denaturierten Proteine für 10 min bei 13200 rpm pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 10 µl H₂O_{dest.}, 2,5 µl 1M Tris-HCl, pH 9,0, 0,5 µl 20 x DTT und 3 µl 5x Auftragspuffer (Fermentas) resuspendiert und nach anschließender Denaturierung (95 °C, 5 min) auf das Gel aufgetragen. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst im Sammelgel für 10 min bei 70 V und anschließend im Trenngel für 50 min bei 200 V. Als Molekulargewichtsmarker diente der Precision Plus ProteinTM Standard 250 – 10 kDa (Bio-Rad). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel für 10 min mit 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure fixiert und danach für 1 min mit 1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 10 % Essigsäure gefärbt. Abschließend erfolgte in einer 10 %igen Essigsäurelösung die Entfernung von nicht-proteingebundenem Farbstoff.

4.4.4 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von Proteinen

Die apparenten molekularen Massen der gereinigten Proteine wurden unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch mittels Ausschluss-Chromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 prepgrade Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) bestimmt. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 1,5 M KCl und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min, das Probenauftragsvolumen betrug 1 ml. Als Molekulargewichtsstandard

dienten das HMW und das LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare). Die Kalibrierung erfolgte nach Herstellerangaben in zwei Läufen. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 150 mM NaCl.

4.4.5 Colorimetrische Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyzuckersäuren

Zur Ermittlung der D-Gluconat-, D-Xylonat- und D-Ribonat-Dehydratase Aktivität wurde nach der Enzymreaktion im Stopptest die Bildung von 2-Keto-3-Desoxy-D-Gluconat (KDG), 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat (KDX) und 2-Keto-3-Desoxy-D-Ribonat (KDR) colorimetrisch mittels Thiobarbitursäure-Test wie folgt quantifiziert (Hurwitz and Weissbach 1959). 25 bis 50 µl KDG-, KDX- oder KDR-haltige Proben wurden mit je 125 µl Periodat-Lösung (0,025 M HJO_4^- in 0,125 M H_2SO_4) versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 250 µl Arsenit-Lösung (2 % NaAsO_2 in 0,5 M HCl) folgte eine Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben mit 1000 µl Thiobarbitursäure-Lösung (0,3 % TBA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) versetzt und für 10 min bei 100 °C im Thermoblock inkubiert. Die Proben wurden nach einer Inkubation für 5 – 10 min auf Eis zentrifugiert (10 min, 13200 rpm) und die Extinktion des Überstandes bei 548 nm gemessen. Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 67,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) konnte die KDG-, KDX- beziehungsweise KDR-Bildung ermittelt werden (Gottschalk and Bender 1982).

4.4.6 Carbazol-Test

Die D-Xylulose- beziehungsweise D-Fructose Konzentrationen wurden colorimetrisch bestimmt (Horecker 1988; Dische and Borenfreund 1951). Dazu wurden 10 µl Probe mit 900 µl H_2SO_4 -Lösung (13 M H_2SO_4), 30 µl Carbazol-Lösung (0,12 % Carbazol in 96 % Ethanol) und 30 µl Cysteinhydrochlorid-Lösung (1,5 % Cysteinhydrochlorid in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm (D-Xylulose) beziehungsweise 560 nm (D-Fructose) gemessen. Die Eichung und Kontrolle des Testsystems für die Bestimmung der D-Xylulose Konzentration erfolgte mit Ribulose-o-nitrophenylhydrazon (maximal 52 µM im Test, 5,7 mg in 10 ml Ethanol 96 %) ($\epsilon = 24,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), während für die Bestimmung der D-Fructose-Konzentration D-Fructose (maximal 52 µM im Test, 2 mM in H_2O) als Standard verwendet wurde ($\epsilon = 16,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Produktbestimmungen der D-Xylose-DH (HVO_B0028) und der L-Arabinose-DH (HVO_B0032), sowie die Aktivität der D-Xylono-/ L-Arabinolactonase (HVO_B0030) wurden mittels HPLC an einer Merck Hitachi LaChrom (Merck) durchgeführt. Die TCA gefällten Proben des Stopptests wurden 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einem Spartan 13/30 Filter (Schleicher und Schuell) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert und anschließend mittels HPLC analysiert. Dazu wurden jeweils 20 µl Probe über eine Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,8 mm, Bio-Rad) mit 9 mM H₃PO₄ als Laufmittel oder über eine EC 250/4 Nucleodur C18 Pyramid Säule (5 µm Partikel, MACHEREY-NAGEL, Düren) mit 5 mM H₂SO₄ als Laufmittel getrennt und mit Hilfe eines Brechungsindex-Detektors L-7490 (RI-Detektor) oder eines UV-VIS-Detektors L-7420 bei 210 nm detektiert.

Produktbestimmung der D-Xylose-Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Es wurden 39 – 117 µg homolog überexprimiertes und gereinigtes Protein (4.5.1) in 600 – 1200 µl Ansätzen mit 30 mM D-Xylose und 10 mM NADP⁺ in 50 mM Tris, pH 8,2 (bei 42 °C) mit 1,5 M KCl und 50 mM MgCl₂ bis zu 60 min inkubiert. Dabei wurden Kontrollen zur Proteinabhängigkeit und Startbarkeit (eine Probe ohne Protein, eine Probe mit hitzedenaturiertem Protein (15 min 100 °C), eine Probe ohne D-Xylose und eine Probe ohne NADP⁺) durchgeführt. Zum Zeitpunkt t_{0min} sowie nach 20 min, 40 min und 60 min wurden 300 µl Aliquots mit 60 µl 30 % TCA gefällt. Das D-Xylonolacton wurde mittels Nucleodur Säule mit 9 mM H₃PO₄ als Laufmittel und einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min bei 30 °C über den RI-Detektor nachgewiesen. Um D-Xylose von D-Xylonat zu unterscheiden, wurde die Nucleodur Säule mit 9 mM H₃PO₄ als Laufmittel und einer Flussgeschwindigkeit von 0,15 ml/min bei 30 °C mittels UV-Detektor verwendet. Mit Hilfe von Standards konnte das Produkt der D-Xylose-DH identifiziert werden, dazu wurden jeweils 30 mM D-Xylose, D-Xylonat, D-Xylonolacton, L-Arabinose, L-Arabinolat sowie L-Arabinolacton (Sequoia Research, Pangbourne, United Kingdom) in dem Messpuffer gelöst und analog zu den Proben TCA gefällt, zentrifugiert, filtriert und mittels HPLC analysiert. Die Retentionszeiten der Standards wurden mit den Retentionszeiten der Substrate sowie der gebildeten Produkte verglichen.

Produktbestimmung der L-Arabinose-Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die Ansätze wurden analog zur Produktbestimmung der D-Xylose-DH durchgeführt, dazu wurden 10 – 40 µg überexprimiertes und gereinigtes Protein (4.5.1) in 50 mM Tris, pH 8,2 (bei 42 °C) mit 1,5 M KCl, 50 mM MgCl₂, 30 mM L-Arabinose und 10 mM NADP⁺ für 0 – 15 min inkubiert. Das L-Arabinolacton wurde mittels Nucleodur Säule mit 9 mM H₃PO₄ als Laufmittel und

einer Flussgeschwindigkeit von 0,15 ml/min bei 30 °C über den RI-Detektor nachgewiesen. Um L-Arabinose von L-Arabinolat zu unterscheiden, wurde die Aminex Säule mit 5 mM H₂SO₄ als Laufmittel und einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min bei 35 °C verwendet. Die Proben wurden von einem RI-Detektor detektiert. Die Produktbestimmung der L-Arabinose-DH erfolgte analog zur D-Xylose-DH mit Hilfe von Standards.

Aktivität der D-Xylono-/ L-Arabinolactonase aus *H. volcanii*. Es wurden 26 – 53 µg homolog überexprimiertes und gereinigtes Protein (4.5.1) in 1000 µl Ansätzen mit 20 mM L-Arabinolacton oder D-Xylonolacton in Messpuffer (50 mM Tris, pH 7,5 (bei 42 °C), 1,5 M KCl, 50 mM MgCl₂) für 0 – 30 min inkubiert. Dabei wurden Kontrollen zur Proteinabhängigkeit und Startbarkeit (eine Probe mit hitzedenaturiertem Protein (15 min 100 °C) und L-Arabinolacton und für jedes Lacton eine Probe ohne Protein) durchgeführt. Die Proben wurden über die Nucleodur Säule mit 9 mM H₃PO₄ als Laufmittel und einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min bei 30 °C getrennt und mittels RI-Detektor nachgewiesen. Mit Hilfe von Standards konnte die Umsetzung von Lactonen gezeigt werden, dazu wurden jeweils 20 mM D-Xylonat, D-Xylonolacton, L-Arabinolat und L-Arabinolacton in dem Messpuffer gelöst und anschließend wie die Proben behandelt und mittels HPLC analysiert. Die Retentionszeiten dieser Standards und der Proben wurden verglichen, des Weiteren wurde eine Veränderung der Peakflächen der Substrate sowie der gebildeten Produkte über die Zeit bestimmt.

4.5 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen

Die säulenchromatographische Reinigung von Proteinen wurde unter Verwendung von FPLC-Systemen von Biorad (Biologic HR Workstation, Bio-Rad) und GE Healthcare (ÄKTA FPLC, GE Healthcare) bei Raumtemperatur durchgeführt. Verwendet wurden eine Nickel-NTA-Säule (1 ml, QIAGEN, Hilden oder GE Healthcare), eine HiLoad 16/60 Superdex 200 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) und eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule. Durch die Absorptionsmessung bei 280 nm wurde die Elution der Proteine von der Säule verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität des Enzyms ist neben der Aktivität (U/ml) (4.5.2) die Proteinkonzentration nach Bradford (4.4.2) bestimmt worden.

4.5.1 Reinigung von Proteinen

Ultrafiltration. Ultrafiltrationen wurden mit Hilfe einer 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) durchgeführt. Diese Methode diente der Ankonzentrierung von Proteinlösungen während der Proteinreinigung. Die Ultrafiltration wurde mit einem Filter mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa durchgeführt. Nach erfolgter Ultrafiltration wurden die Proben 10 min bei 13200 rpm und 4°C in einer Kühlzentrifuge (5415 R, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Reinigung von rekombinaten Proteinen. Die in *H. volcanii* H1209 überexprimierten Proteine, kodiert von HVO_B0030, HVO_B0032 und HVO_B0028 aus *H. volcanii*, rrnAC0575, rrnAC3032 und rrnAC3036 aus *H. marismortui*, sowie Huta_2443 aus *H. utahensis* wurden säulenchromatographisch bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt. Die für die HPLC Analysen (4.4.7) verwendeten Proteine wurden über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt.

Zur Reinigung der Proteine wurden die Zellpellets in 25 ml Puffer A (50 mM Tris, pH 8,2, 1,5 – 2 M KCl, 5 mM Imidazol, die Puffer A und B zur Reinigung der Dehydratasen enthielten zusätzlich 50 mM MgCl₂) resuspendiert und mittels fünfmaliger Hochdruck-homogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (French Pressure Cell Press, American Instrument Company, Silver Spring USA) bei 16000 psi aufgeschlossen. Diese Suspension wurde für 1,5 h bei 40000 rpm und 4 °C (Optima L Preparative Ultracentrifuge, 70 TI Rotor, Beckman) ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden mit Puffer A auf 50 – 100 ml aufgefüllt und auf eine mit Puffer A equilibrierte Nickel-NTA-Säule mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer B (50 mM Tris, pH 8,2, 1,5 – 2 M KCl, 500 mM Imidazol) über einem Stufengradienten für jeweils 10 ml mit 20 mM Imidazol, 100 mM Imidazol und 500 mM Imidazol. Eluiertes Protein wurde fraktioniert gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration aus der spezifischen Elution wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (4.5.1) auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit 50 mM Tris, pH 7,5 – 8 und 1,5 – 2 M KCl equilibriert worden war. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min. Die Proteine wurden in Fraktionen von 1 ml gesammelt.

Reinigung von nativen Proteinen. Die D-Xylonat-Dehydratase, die D-Ribonat-Dehydratase und die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase wurden aus 9 g D-Xylose gewachsenen *H. marismortui* Zellen (AG Schönheit), die D-Gluconat-Dehydratase aus 7 g D-Glucose gewachsenen *H. marismortui* Zellen (AG Schönheit) gereinigt. Dazu wurden die Zellen in 25 ml Auftragspuffer (0,1 mM Tris, pH 8,0, 2 M Ammoniumsulfat, 50 mM MgCl_2) resuspendiert und mittels fünfmaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (French Pressure Cell Press, American Instrument Company, Silver Spring USA) bei 16000 psi aufgeschlossen. Diese Suspension wurde für 1,5 h bei 40000 rpm und 4 °C (Optima L Preparative Ultracentrifuge, 70 TI Rotor, Beckman) ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden mit Auftragspuffer auf 50 ml aufgefüllt und auf eine mit Auftragspuffer equilibrierte Phenyl Sepharose 26/10 Säule mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Auftragspuffer für 150 ml, erfolgte die Elution mit Elutionspuffer (0,1 mM Tris, pH 8,0, 50 mM MgCl_2) mittels eines linearen Gradienten von 2 – 0 M Ammoniumsulfat über 450 ml. Eluiertes Protein wurde in 6 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit den jeweils höchsten spezifischen Aktivitäten wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (4.5.1) auf ein Volumen von 1 ml eingengt und nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13200 rpm und 4 °C auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit 50 mM Tris, pH 7,5, 1,5 M KCl equilibriert worden war. Die Proteine wurden mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min von der Säule eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Es wurden die Proteinkonzentrationen der Fraktionen bestimmt und mittels SDS-PAGE (4.4.3) die Reinheit der Proteine abgeschätzt. Die Proteine waren partiell gereinigt, so dass sie mit Hilfe des Aktivitätsprofils in den jeweiligen SDS-Gelen identifiziert werden konnten. Die gereinigten Proteine wurden mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Identifizierung der jeweiligen kodierenden Gene mit Hilfe von Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Bott im Forschungszentrum Jülich.

4.5.2 Charakterisierung von gereinigten Proteinen

Messung von Enzymaktivitäten. Die Messung von Aktivitäten der gereinigten Enzyme oder in Rohextrakten erfolgte im Stopptest oder in einer kontinuierlichen Messung in einem Volumen von 0,2 – 1 ml. Dabei wurden Einmalküvetten aus Kunststoff mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Die Reaktionsansätze für den Stopptest wurden über einen Zeitraum von 0 bis zu 3 h bei 37 – 42 °C in einem Thermoblock TB1 (Biometra) inkubiert. Dabei wurden zu jeder Messung Kontrollen zur Proteinabhängigkeit und Startbarkeit durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von TCA gestoppt. Anschließend wurden die Aliquots für 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert und die Überstände für die Detektion eingesetzt (4.4.5 und 4.4.6). Kontinuierliche Messungen wurden photometrisch in einem beheizbaren Ultrospec 2000 Photometer (GE Healthcare) in Puffer bei 30 – 42 °C gemessen und die Raten am Schreiber L250E (Linseis, Selb) verfolgt. Jede Küvette wurde vor Substrat- und Enzymzugabe im Photometer inkubiert, bis die gewünschte Temperatur erreicht war. Bei den Messungen wurden die Substratreihenfolge und die Enzymmengen variiert, um die Startbarkeit und die Proteinabhängigkeit der Tests zu überprüfen. K_m - und V_{max} -Werte wurden aus der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk bestimmt. Die Enzymaktivität 1 Unit (U) gibt den Verbrauch von 1 μ mol Substrat, beziehungsweise die Bildung von 1 μ mol Produkt pro Minute an.

D-Xylono-/ L-Arabinolactonase aus *H. volcanii*. Die Aktivität der Lactonase wurde mit Hilfe des p-Nitrophenol-Tests (Hucho and Wallenfels 1972) ermittelt. Dabei wird die Freisetzung von Protonen bestimmt, die bei der Hydrolyse der Lactone zu den entsprechenden Säuren entstehen. Die Protonierung von p-Nitrophenol wurde als eine Abnahme der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen, so dass die Enzymaktivitäten der Lactonase als eine Extinktionsänderung pro min und mg Protein ($\Delta E/\text{min mg}^{-1}$) angegeben wurden. Die Aktivität wurde in 0,2 – 1 ml Ansätzen gemessen, dazu wurde Puffer im beheizbaren Photometer auf 42 °C erwärmt. Es wurden 0,125 – 0,25 mM p-Nitrophenol und Lactone in unterschiedlichen Konzentrationen in die Küvetten gegeben, danach konnte die spontane Hydrolyse der Lactone am Schreiber bestimmt werden. Anschließend wurde überexprimiertes und gereinigtes Protein (4.5.1) hinzugegeben und die Rate erneut am Schreiber verfolgt. Zur Bestimmung der Lactonase Aktivität wurde die Rate des Enzyms um die Rate der spontanen Hydrolyse korrigiert.

Die 0,2 – 1 ml Reaktionsansätze zur Charakterisierung der Lactonase wurden bei 42 °C in 10 mM BisTris, pH 7,5 (bei 42 °C) mit 1,5 M KCl und 50 mM MgCl₂ gemessen. Zur Charakterisierung des Substratspektrums wurden als Substrate jeweils 10 mM L-Arabinolacton, D-Xylonolacton, D-Ribonolacton, D-Galactonolacton oder D-Gluconolacton in Puffer mit 0,25 mM p-Nitrophenol und 2,3 – 9,4 µg Protein eingesetzt. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der K_m-Werte für L-Arabinolacton, D-Xylonolacton, D-Galactonolacton und D-Gluconolacton enthielten 0,125 mM p-Nitrophenol (für D-Gluconolacton 0,25 mM), jeweils 0 – 35 mM Lacton und 345 ng Protein. Um den Einfluss von KCl auf die Enzymaktivität zu testen, enthielten die Reaktionsansätze Puffer mit 0 – 3,5 M KCl, 0,125 mM p-Nitrophenol, 10 mM L-Arabinolacton und 345 ng Protein. Die Abhängigkeit von divalenten Kationen wurde in Puffer ohne MgCl₂, mit 10 mM L-Arabinolacton, 345 ng Protein und jeweils 1 mM divalente Kationen (MgCl₂, MnCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, NiCl₂ oder FeCl₂) bestimmt. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des Einflusses von MgCl₂ enthielten Puffer ohne MgCl₂, 10 mM L-Arabinolacton, 345 ng Protein und 0 – 10 mM MgCl₂.

D-Xylonat-Dehydratase aus *H. marismortui*. Die D-Xylonat-Dehydratase katalysiert die Dehydratisierung der Zuckersäure D-Xylonat zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat (KDX). Die Aktivität wurde durch colorimetrische Quantifizierung des Reaktionsproduktes KDX gemessen (4.4.5).

Die 0,5 ml Reaktionsansätze wurden bei 37 °C in 0,1 M Tris, pH 8,5 (bei 37 °C) mit 1 M KCl und 25 mM MgCl₂ mit Protein, das zuvor überexprimiert und gereinigt wurde (4.5.1), gemessen. Zur Charakterisierung des Substratspektrums wurden jeweils 10 mM D-Gluconat, D-Xylonat, L-Arabinat, D-Galactonat und D-Ribonat in Puffer mit 4,8 µg Protein eingesetzt und für 0 – 940 min inkubiert. Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zeiten durch die Zugabe von final 5 % TCA gestoppt.

D-Ribonat-Dehydratase aus *H. marismortui*. Die D-Ribonat-Dehydratase katalysiert die Dehydratisierung der Zuckersäure D-Ribonat zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Ribonat (KDR). Die Aktivität wurde durch colorimetrische Quantifizierung des Reaktionsproduktes KDR gemessen (4.4.5).

Die 0,5 ml Reaktionsansätze wurden bei 37 °C in 0,1 M Tris, pH 8,0 (bei 42 °C) mit 2 M KCl und 25 mM MgCl₂ mit Protein, das zuvor überexprimiert und gereinigt wurde (4.5.1),

gemessen. Zur Charakterisierung des Substratspektrums wurden jeweils 5 oder 50 mM D-Gluconat, D-Xylonat, L-Arabinat, D-Galactonat oder D-Ribonat in Puffer mit 6,6 µg Protein eingesetzt und für 0 – 16 h inkubiert. Die Reaktion wurde zu unterschiedlichen Zeiten durch die Zugabe von final 5 % TCA gestoppt.

α -KGSA-Dehydrogenase aus *H. marismortui*. Die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase katalysiert die NAD(P)^+ abhängige Oxidation von α -Ketoglutarat-Semialdehyd zu α -Ketoglutarat. Das gebildete NAD(P)H konnte photometrisch bei 340 nm gemessen und die Aktivität berechnet werden ($\epsilon_{\text{NADH}340\text{nm}} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{NADPH}340\text{nm}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Die 0,2 ml Reaktionsansätze wurden bei 37 °C in 0,1 M HEPES, pH 8,5 (bei 37 °C) mit 1 M KCl mit Protein, das zuvor überexprimiert und gereinigt wurde (4.5.1), gemessen. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für α -Ketoglutarat-Semialdehyd enthielten Puffer, 0 – 20 mM α -Ketoglutarat-Semialdehyd, 1 mM NADP^+ und 0,85 – 3,4 µg Protein. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für Glutardialdehyd enthielten 0 – 10 mM Glutardialdehyd, 1 mM NADP^+ und 340 ng Protein. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für NADP^+ enthielten 0 – 1 mM NADP^+ , 2,5 mM Glutardialdehyd und 340 ng Protein. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für NAD^+ enthielten 0 – 5 mM NAD^+ , 2,5 mM Glutardialdehyd und 340 ng Protein. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für Succinatsemialdehyd enthielten 0 – 15 mM Succinatsemialdehyd, 1 mM NADP^+ und 3,4 µg Protein.

D-Xylose-Isomerase aus *H. utahensis*. Die D-Xylose-Isomerase katalysiert die reversible Umwandlung von D-Xylose zu D-Xylulose. Die Aktivität wurde durch colorimetrische Quantifizierung des Reaktionsproduktes D-Xylulose gemessen (4.4.6).

Die 0,6 ml Reaktionsansätze wurden bei 37 °C in 0,1 M Tris, pH 8,0 (bei 37 °C) mit 2 M KCl, 20 mM MgCl_2 , 1 mM CoCl_2 und mit Protein, das zuvor überexprimiert und gereinigt wurde (4.5.1), inkubiert. Jeweils 125 µl der Proben wurden für 0 – 30 min inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von final 5 % TCA gestoppt. Anschließend wurde das gebildete Produkt quantifiziert. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für D-Xylose enthielten 0 – 125 mM D-Xylose und 41 µg Protein. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung des K_m -Wertes für D-Glucose enthielten 0 – 200 mM D-Glucose und 82 µg Protein.

4.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten in Zellextrakten

Herstellung von Zellextrakten. Es wurden 20 – 50 ml Kultur für 10 min mit 12000 rpm bei 8 °C zentrifugiert (Zentrifuge AvantiTM J-25, Rotor JA 25.50, Beckman). Die Zellpellets wurden in 0,5 – 1 ml Messpuffer des jeweiligen Enzyms resuspendiert und mittels Ultraschall (Sonifier 250 Ultraschall Desintegrator, Branson Heinemann, Schwäbisch Gmünd) im Eisbad bei duty cycle 30 % und output control 3 für 1 min mit 3 – 5 Wiederholungen aufgeschlossen. Die entstandenen Homogenisate wurden für 10 – 20 min bei 13200 rpm und 8 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in den jeweiligen Enzymmessungen eingesetzt.

α -Ketoglutarat Bildung. Die Bildung von α -Ketoglutarat aus D-Xylonat oder D-Ribonat wurde in Zellextrakten als NADP⁺- und D-Xylonat- beziehungsweise D-Ribonat-abhängige Rate gemessen. Die α -Ketoglutarat Detektion erfolgte enzymatisch über die reduktive Transaminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat. Die Reaktion wurde von der Glutamat-Dehydrogenase katalysiert und konnte photometrisch über das gebildete NADH bei 340 nm gemessen und die Aktivität berechnet werden ($\epsilon_{\text{NADH}340\text{nm}} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Die Bildung von α -Ketoglutarat aus D-Xylonat und D-Ribonat in Zellextrakten aus D-Xylose, D-Ribose und D-Glucose gewachsenen *H. marismortui* Kulturen wurde in 200 μ l Reaktionsansätzen bei 37 °C in 0,1 M HEPES, pH 8,0 (bei 37 °C) mit 2 M KCl, 50 mM MgCl₂, 4 mM NADP⁺, 80 mM D-Xylonat oder 40 mM D-Ribonat und 1000 – 1300 μ g Protein bestimmt. Nach dem Start der Reaktion sowie 60 min und 120 min danach, wurden 60 μ l Aliquots entnommen und die Reaktion durch eine Inkubation für 10 min auf Eis gestoppt. Anschließend folgte die Detektion von α -Ketoglutarat mittels Glutamat-Dehydrogenase in 1 ml Reaktionsansätzen bei Raumtemperatur in 0,1 M Tris, pH 7,5 mit 40 mM NH₄Cl, 0,3 mM NADH, 1 U Glutamat-DH und 50 μ l der Aliquots. Das D-Ribonat wurde aus D-Ribono- γ -lacton hergestellt, dazu wurde das Lacton in 1 M NaOH für 1 h bei 100 °C inkubiert, anschließend wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen 1 M HCl neutralisiert und der pH-Wert kontrolliert.

D-Xylose-Isomerase Aktivität in *H. utahensis*. Die D-Xylose-Isomerase katalysiert die reversible Umwandlung von D-Xylose zu D-Xylulose. Die Aktivität wurde durch colorimetrische Quantifizierung des Reaktionsproduktes D-Xylulose gemessen. Der Reaktionsansatz wurde in einem Volumen von 1 ml in 0,1 M Tris, pH 8,0 (bei 42 °C) mit 2 M KCl, 10 mM D-Xylose und 700 µg Protein bei 37 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten (0 – 60 min) wurden 125 µl Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 60 % TCA gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Detektion im Carbazol-Test eingesetzt (4.4.6).

D-Xylulose-Kinase Aktivität in *H. utahensis*. Die D-Xylulose-Kinase katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von D-Xylulose zu D-Xylulose-5-phosphat. Die Abnahme des Substrates D-Xylulose wurde colorimetrisch quantifiziert, dadurch konnte die Aktivität der D-Xylulose-Kinase bestimmt werden. Der Reaktionsansatz wurde in einem Volumen von 300 µl in 0,1 M Tris, pH 8,0 (bei 42 °C) mit 2 M KCl, 10 mM MgCl₂, 4 mM L-Cystein-HCl, 5 mM D-Xylulose, 5 mM ATP und 700 – 1900 µg Protein bei 37 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten (0 – 60 min) wurden 50 µl Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 60 % TCA gestoppt. Die Proben wurden 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Detektion im Carbazol-Test eingesetzt (4.4.6).

5 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Abbau verschiedener Pentosen in den drei halophilen Archaea *Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui* und *Halorhabdus utahensis* durchgeführt. Kürzlich wurde in *Haloferax volcanii* der oxidative Abbau von D-Xylose und L-Arabinose zu α -Ketoglutarat aufgeklärt. Die Gene des Pentoseabbaus liegen auf einem Gencluster, das auch die Gene einer hypothetischen Lactonase sowie eines Transkriptionsregulators enthält. Es ist noch ungeklärt, ob die Lactonase an dem Pentoseabbau beteiligt ist. Für den Transkriptionsregulator wurde eine essentielle Beteiligung am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose gezeigt, allerdings fehlen detaillierte Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation. In *Haloarcula marismortui* wurde eine D-Xylose-/D-Ribose-Dehydrogenase identifiziert, die den ersten Schritt des oxidativen Abbaus von D-Xylose und D-Ribose katalysiert. Der weitere Abbau dieser Pentosen ist bisher nicht untersucht. Für *Halorhabdus utahensis* wird auf Grund von Genomuntersuchungen vermutet, dass D-Xylose, wie in den meisten Bacteria, mittels D-Xylose-Isomerase und D-Xylulose-Kinase abgebaut wird. Ein Nachweis der Enzymaktivitäten sowie die Charakterisierung des Schlüsselenzyms, D-Xylose-Isomerase, stehen noch aus. Um die offenen Fragen dieser beschriebenen Sachverhalte zu klären, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Ein erster experimenteller Hinweis für die Beteiligung einer Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii* wurde mit Hilfe von Transkriptanalysen gezeigt. Anschließend wurden die Produkte der XDH und AraDH bestimmt, wobei die Bildung von den Lactonen nachgewiesen werden konnte. Die funktionelle Beteiligung der Lactonase wurde durch die Überexpression und die Charakterisierung der gereinigten Lactonase gezeigt. Abschließend wurde eine Deletionsmutante der Lactonase hergestellt und analysiert.
2. Die pentosespezifische, transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* wurde untersucht. Dabei wurde XacR als transkriptioneller Aktivator des Pentoseabbaus sowie ein essentieller Bereich zur transkriptionellen Aktivierung identifiziert. Außerdem wurde gezeigt, dass XacR als Repressor seiner eigenen Synthese fungiert, ein potentiell Repressorbindemotiv wurde identifiziert.

3. In Zellextrakten von D-Xylose und D-Ribose gewachsenen *H. marismortui* Zellen wurde die α -Ketoglutarat Bildung aus D-Xylonat und D-Ribonat sowie die Enzymaktivitäten einer D-Xylonat-Dehydratase (XAD) und einer D-Ribonat-Dehydratase (RAD) nachgewiesen. Außerdem wurden die XAD, die RAD und die KGSADH gereinigt und die kodierenden Gene identifiziert. Anschließend wurden die identifizierten Gene überexprimiert und die rekombinanten Enzyme biochemisch charakterisiert.
4. Das Wachstum von *Halorhabdus utahensis* wurde auf D-Xylose nachgewiesen und die Enzymaktivitäten einer D-Xylose-Isomerase und einer D-Xylulose-Kinase in Zellextrakten gemessen. Das Gen Huta_2443, das für eine putative D-Xylose-Isomerase kodiert, wurde überexprimiert und das gereinigte rekombinante Enzym charakterisiert.

5.1 D-Xylose- und L-Arabinoseabbau in *Haloferax volcanii*

5.1.1 Beteiligung einer Lactonase (HVO_B0030) am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose

Das Gen HVO_B0030 liegt zwischen den Genen des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* (Abbildung 5). Auf Grund von bioinformatischen Analysen wurde postuliert, dass das Gen für eine Lactonase kodiert, die am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii* beteiligt ist.

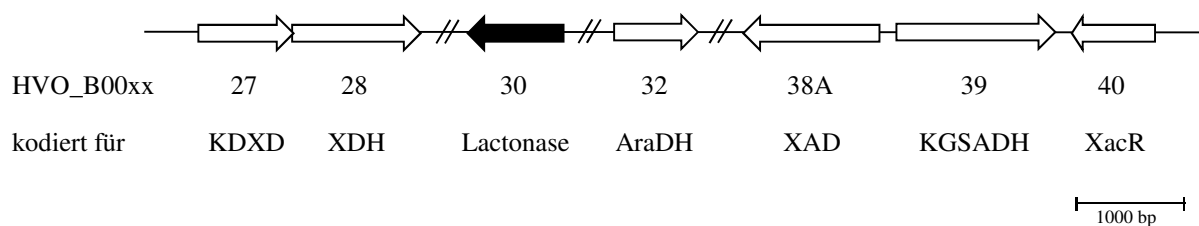


Abbildung 5 Genomumgebung der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013). Die offenen Leserahmen (ORFs) HVO_B0027, HVO_B0028, HVO_B0030, HVO_B0032, HVO_B0038A, HVO_B0039 und HVO_B0040 sind als Pfeile dargestellt und kodieren für die 2-Keto-3-Deoxy-D-Xylonat-Dehydratase (KDXD), D-Xylose-Dehydrogenase (XDH), eine putative Lactonase, L-Arabinose-Dehydrogenase (AraDH), D-Xylonat-Dehydratase (XAD), α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH) und den Transkriptionsregulator XacR. Die Lactonase wurde schwarz markiert. Der Maßstab weist eine Länge von 1000 bp auf.

5.1.1.1 Transkriptanalyse der Lactonase

Für den ersten Hinweis einer Beteiligung von HVO_B0030 am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii* wurde untersucht, ob HVO_B0030 einer pentosespezifischen transkriptionellen Regulation unterliegt. Die Transkriptanalyse von HVO_B0030 erfolgte mittels Northern Blot mit RNA aus D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen im Vergleich zu D-Glucose gewachsenen Zellen (Abbildung 6). Es konnte ein spezifisches Signal in D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen nachgewiesen werden, dabei war die ermittelte Transkriptlänge von etwa 1200 nt höher als die Länge des Gens HVO_B0030 (876 bp). Das größere Transkript deutet vermutlich auf das Vorhandensein von 5'- und 3'-untranslatierten Bereichen (UTR) hin, wie es für einige Haloarchaea gezeigt wurde. In D-Glucose gewachsenen Zellen konnte nur ein sehr schwaches Signal nachgewiesen werden, dies spricht für eine transkriptionelle Induktion des Gens HVO_B0030 durch D-Xylose und L-Arabinose.

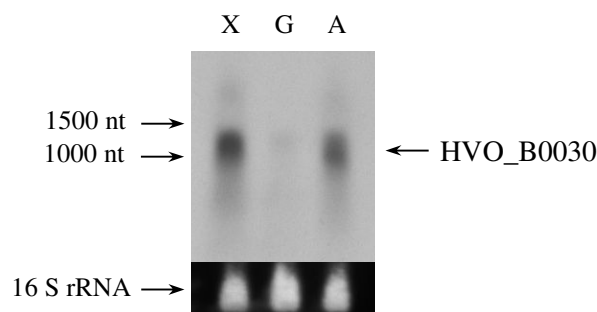


Abbildung 6 Transkriptionsanalyse des Gens HVO_B0030 aus *H. volcanii*. Dargestellt ist ein Northern Blot mit RNA aus Zellen, die auf D-Xylose (X), D-Glucose (G) oder L-Arabinose (A) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit einer spezifischen Sonde für HVO_B0030 nachgewiesen. Die 16 S rRNA diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels mit RNA und wurde durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

5.1.1.2 Nachweis der enzymkatalysierten Lactonbildung aus D-Xylose und L-Arabinose

Die Beteiligung der Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose könnte darauf beruhen, dass die D-Xylose-Dehydrogenase und die L-Arabinose-Dehydrogenase die Umsetzung von D-Xylose und L-Arabinose zu den entsprechenden Lactonen katalysieren, die dann als Substrate der Lactonase dienen könnten. Um dies zu prüfen, wurden die beiden Dehydrogenasen homolog überexprimiert, die rekombinanten Enzyme gereinigt und die Produkte der NADP⁺ abhängigen Oxidation von D-Xylose und L-Arabinose analysiert.

D-Xylose-Dehydrogenase. Das gereinigte Enzym wurde mit D-Xylose und NADP⁺ über einen Zeitraum von 60 min inkubiert, zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und das gebildete Produkt dieser Reaktion mittels HPLC analysiert. In Abbildung 7 sind Ausschnitte aus den HPLC Chromatogrammen gezeigt, dabei ist die Zeit- und NADP⁺-abhängige Bildung des D-Xylonolactons dargestellt, während in einem Kontrollansatz ohne NADP⁺ kein D-Xylonolacton nachgewiesen werden konnte. Die Identität des D-Xylonolactons wurde über einen Vergleich der Retentionszeit des gebildeten Produktes mit den Retentionszeiten von Standards nachgewiesen. Die Chromatogramme von D-Xylose und D-Xylonolacton sind in Abbildung 7 dargestellt, dabei zeigte der Standard des D-Xylonolactons auch einen geringen Anteil von D-Xylonat. Unter den gewählten Analysebedingungen konnte die D-Xylose nicht von D-Xylonat unterschieden werden, deshalb wurde die Probe nach einer Inkubation von 60 min mit einem UV-Detektor analysiert (nicht dargestellt). So konnte auch die Bildung von D-Xylonat nachgewiesen werden, das vermutlich auf Grund der nicht enzymatischen spontanen Hydrolyse des D-Xylonolactons unter den Analysebedingungen gebildet wurde (Abbildung 10).

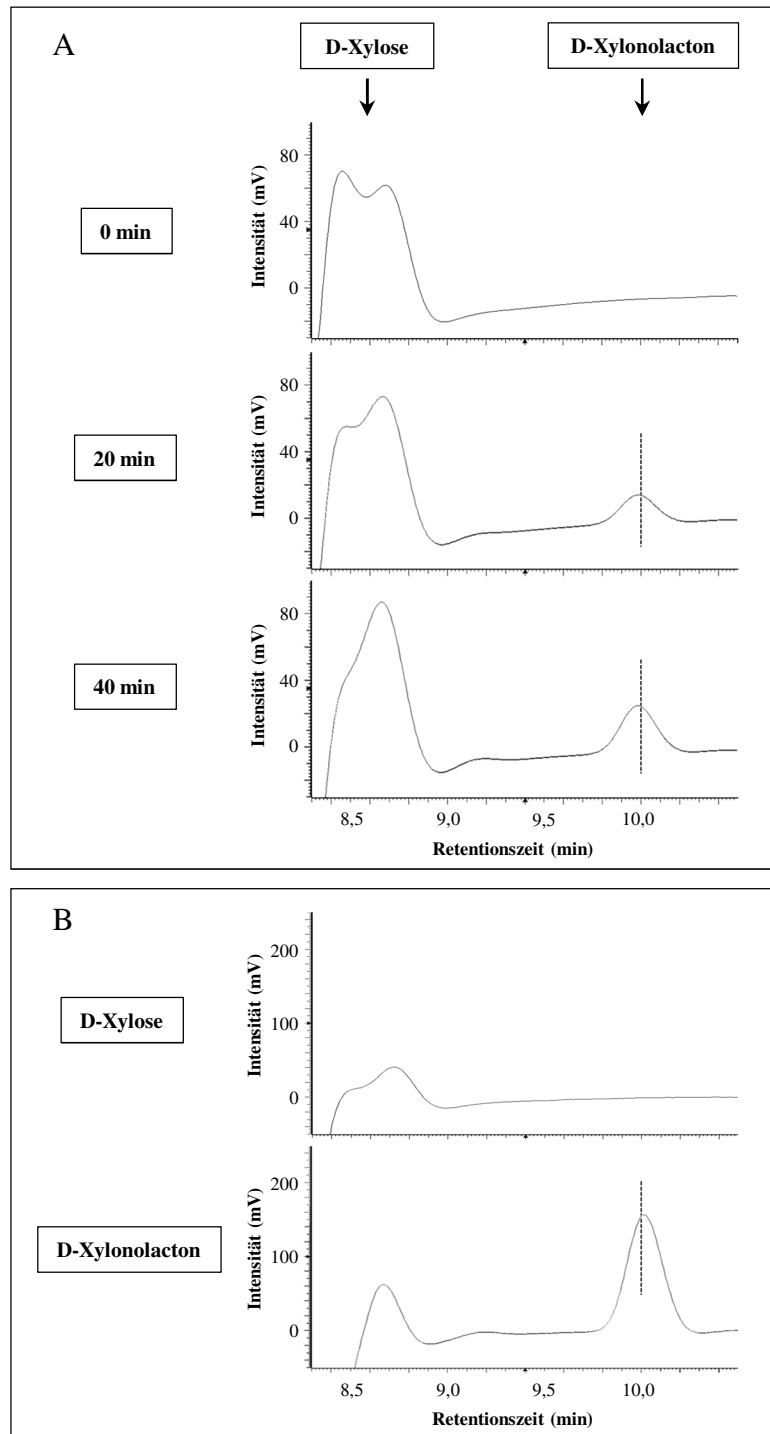


Abbildung 7 NADP^+ abhängige Umsetzung von D-Xylose zu D-Xylonolacton katalysiert von der D-Xylose-Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die Proben wurden mittels HPLC mit einer Nucleodur Säule, einem RI-Detektor und einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min analysiert, es sind Ausschnitte der Chromatogramme abgebildet. Die Abbildung (A) zeigt die Produktbildung der XDH, dargestellt sind die Chromatogramme der Probe zu Beginn der Reaktion ($t = 0$ min), nach 20 min und nach 40 min. Die Abbildung (B) zeigt die Standards 10 mM D-Xylose und D-Xylonolacton, der Standard D-Xylonolacton weist auch einen Anteil D-Xylonat auf. Retentionszeiten der Standards: D-Xylose (8,73 min), D-Xylonolacton (10,01 min), D-Xylonat (8,66 min, nicht dargestellt). Das gebildete Produkt und der Standard D-Xylonolacton sind durch eine gestrichelte Linie markiert.

L-Arabinose-Dehydrogenase. Es wurde untersucht, ob die gereinigte rekombinante L-Arabinose-Dehydrogenase die NADP^+ abhängige Umsetzung von L-Arabinose zu Arabinolacton katalysiert. Dazu wurde das Enzym mit L-Arabinose und NADP^+ 15 min inkubiert und zu verschiedenen Zeiten entnommene Proben mittels HPLC analysiert (Abbildung 8). Dabei zeigte sich die Zeit- und NADP^+ -abhängige Bildung eines Peaks, dessen Identität über einen Vergleich mit Standards als L-Arabinolacton nachgewiesen wurde. Neben der Zeit-abhängigen Bildung des L-Arabinolactons konnte auch eine geringe Abnahme der L-Arabinose gezeigt werden. Außerdem sind die Chromatogramme der Standards L-Arabinose und L-Arabinolacton dargestellt. Unter den gewählten Analysebedingungen konnte die L-Arabinose nicht von L-Arabinolacton unterschieden werden. Deshalb wurde die Probe nach einer Inkubation von 15 min mit einer Aminex Säule analysiert (nicht dargestellt), dabei wurde kein L-Arabinolacton nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die D-Xylose-Dehydrogenase und die L-Arabinose-Dehydrogenase die NADP^+ abhängige Oxidation von D-Xylose und L-Arabinose zu den entsprechenden Lactonen katalysieren. Diese Lactone stellen mögliche Substrate für die Lactonase dar, was für die Beteiligung der Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii* spricht.

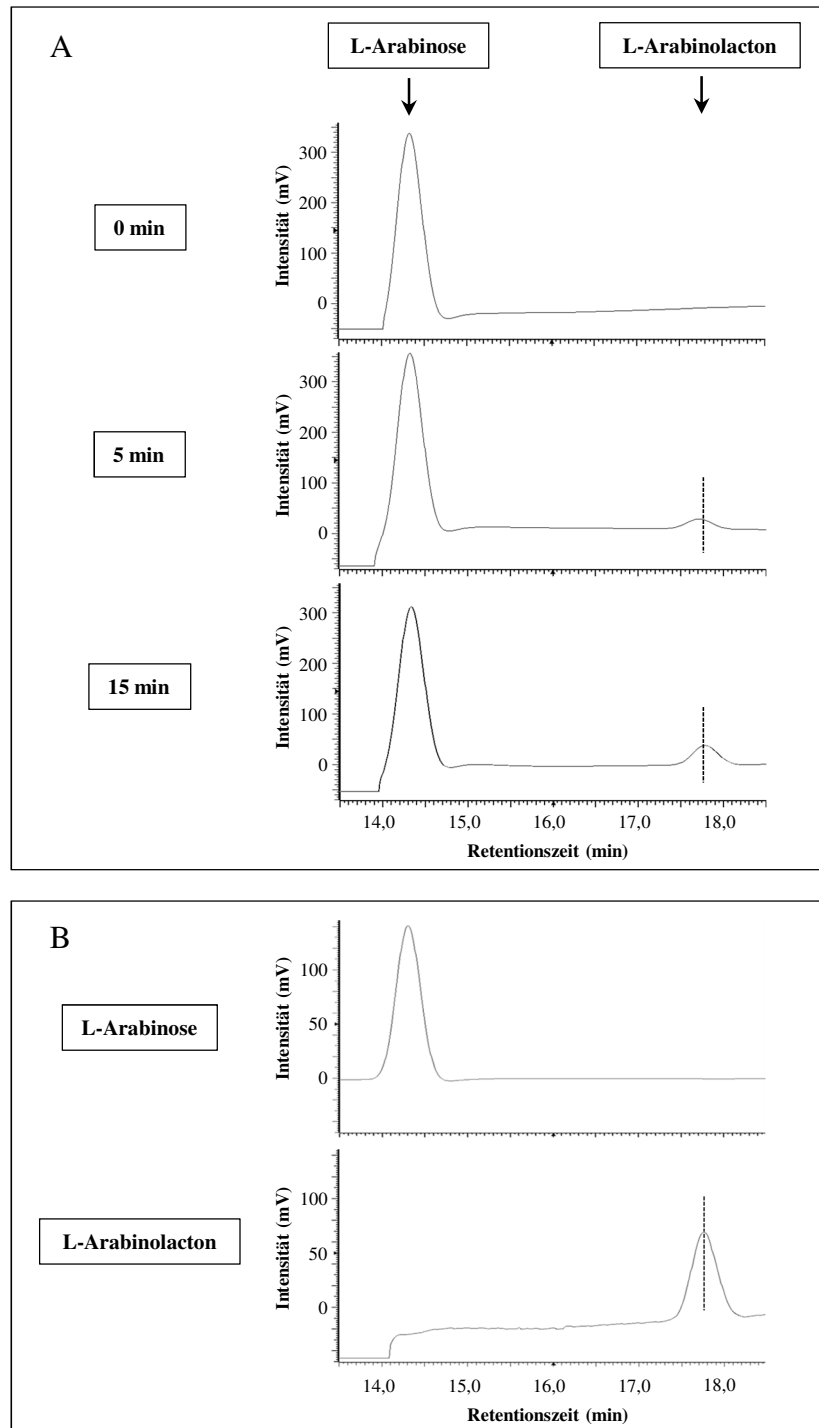


Abbildung 8 NADP^+ abhängige Umsetzung von L-Arabinose zu L-Arabinolacton katalysiert von der L-Arabinose-Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die Proben wurden mittels HPLC mit einer Nucleodursäule, einem RI-Detektor und einer Flussgeschwindigkeit von 0,15 ml/min analysiert, es sind Ausschnitte der Chromatogramme abgebildet. Die Abbildung (A) zeigt die Produktbildung der AraDH, dargestellt sind die Chromatogramme der Probe zu Beginn der Reaktion ($t = 0$ min), nach 5 min und 15 min. Die Abbildung (B) zeigt die Standards 10 mM L-Arabinose und L-Arabinolacton. Retentionszeiten der Standards: L-Arabinose (14,3 min), L-Arabinolacton (17,76 min), L-Arabinolacton (14,05 min, nicht dargestellt). Das gebildete Produkt und der Standard L-Arabinolacton sind durch eine gestrichelte Linie markiert.

5.1.1.3 Charakterisierung der rekombinanten Lactonase

Im Folgenden wurde untersucht, ob die putative Lactonase, kodiert von HVO_B0030, die Hydrolyse des D-Xylonolactons und des L-Arabinolactons katalysiert. Dazu wurde HVO_B0030 amplifiziert und in das Plasmid pTA963 ligiert, dieses Konstrukt wurde in *H. volcanii* H1209 transformiert. Nach homologer Überexpression wurde das Protein mittels Ni-NTA und Größenausschlusschromatographie gereinigt und anschließend charakterisiert. Das apparente Molekulargewicht der Lactonase wurde unter nativen Bedingungen mittels Gelfiltration auf 28 kDa bestimmt, die SDS-PAGE ergab eine Bande von 35 kDa (Abbildung 9), was für eine monomere Form des Enzyms spricht.

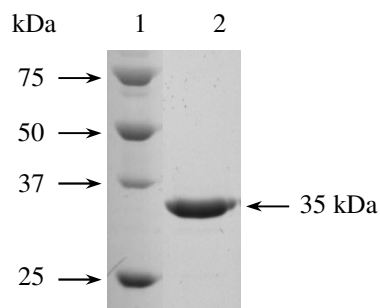


Abbildung 9 Gereinigte rekombinante Lactonase (HVO_B0030) aus *H. volcanii*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter Lactonase, die N-terminal zusätzlich 6 Histidine aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der Lactonase. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: Lactonase nach Superdex Gelfiltration.

Die Hydrolyse der Lactone zu den entsprechenden Säuren wurde mittels HPLC analysiert. Dazu wurde das gereinigte Enzym mit D-Xylonolacton oder L-Arabinolacton 15 min inkubiert, dabei wurden Proben entnommen und anschließend analysiert.

Umsetzung des L-Arabinolactons. In Abbildung 10A sind Ausschnitte von übereinander gelegten Chromatogrammen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass eine Inkubation des Lactons mit der Lactonase zu einer Abnahme des L-Arabinolactons und einer Zunahme von L-Arabinat führte. Das L-Arabinolacton und das L-Arabinat zeigten dabei deutlich unterschiedliche Retentionszeiten und wurden über einen Vergleich mit den Retentionszeiten von Standards identifiziert. In einem Kontrollansatz ohne Lactonase wurden nach 15 min ebenfalls die Abnahme des L-Arabinolactons und die Zunahme des L-Arabinats gezeigt, allerdings in einem deutlich geringeren Umfang. Dies zeigt, dass neben der enzymkatalysierten Hydrolyse des Lactons auch eine geringfügige spontane Hydrolyse des Lactons nachgewiesen wurde.

Umsetzung des D-Xylonolactons. Wie für den Umsatz von L-Arabinolacton beschrieben, katalysierte die Lactonase auch die Hydrolyse des D-Xylonolactons zu D-Xylonat. Übereinandergelegte Ausschnitte der Chromatogramme sind in Abbildung 10B dargestellt. Bereits zum Beginn der Reaktion ($t = 0$ min) konnte neben dem Substrat D-Xylonolacton auch D-Xylonat nachgewiesen werden. Nach einer 15 minütigen Inkubation der Lactonase und des D-Xylonolactons konnte die Abnahme des D-Xylonolactons sowie die Zunahme von D-Xylonat nachgewiesen werden. Deren Retentionszeiten unterschieden sich ebenfalls deutlich und wurden über einen Vergleich mit den Retentionszeiten von Standards identifiziert. Für das D-Xylonolacton konnte, wie für das L-Arabinolacton gezeigt, ebenfalls eine spontane Hydrolyse nachgewiesen werden, ebenfalls in einem deutlich geringeren Umfang, als die enzymkatalysierte Hydrolyse des Lactons.

Die Ergebnisse zeigen, dass HVO_B0030 für eine Lactonase kodiert, die die Hydrolyse von L-Arabinolacton und D-Xylonolacton zu den entsprechenden Säuren katalysiert. Die weitere Charakterisierung der D-Xylono-/L-Arabinolactonase (XANL) erfolgte mit Hilfe des p-Nitrophenol Tests.

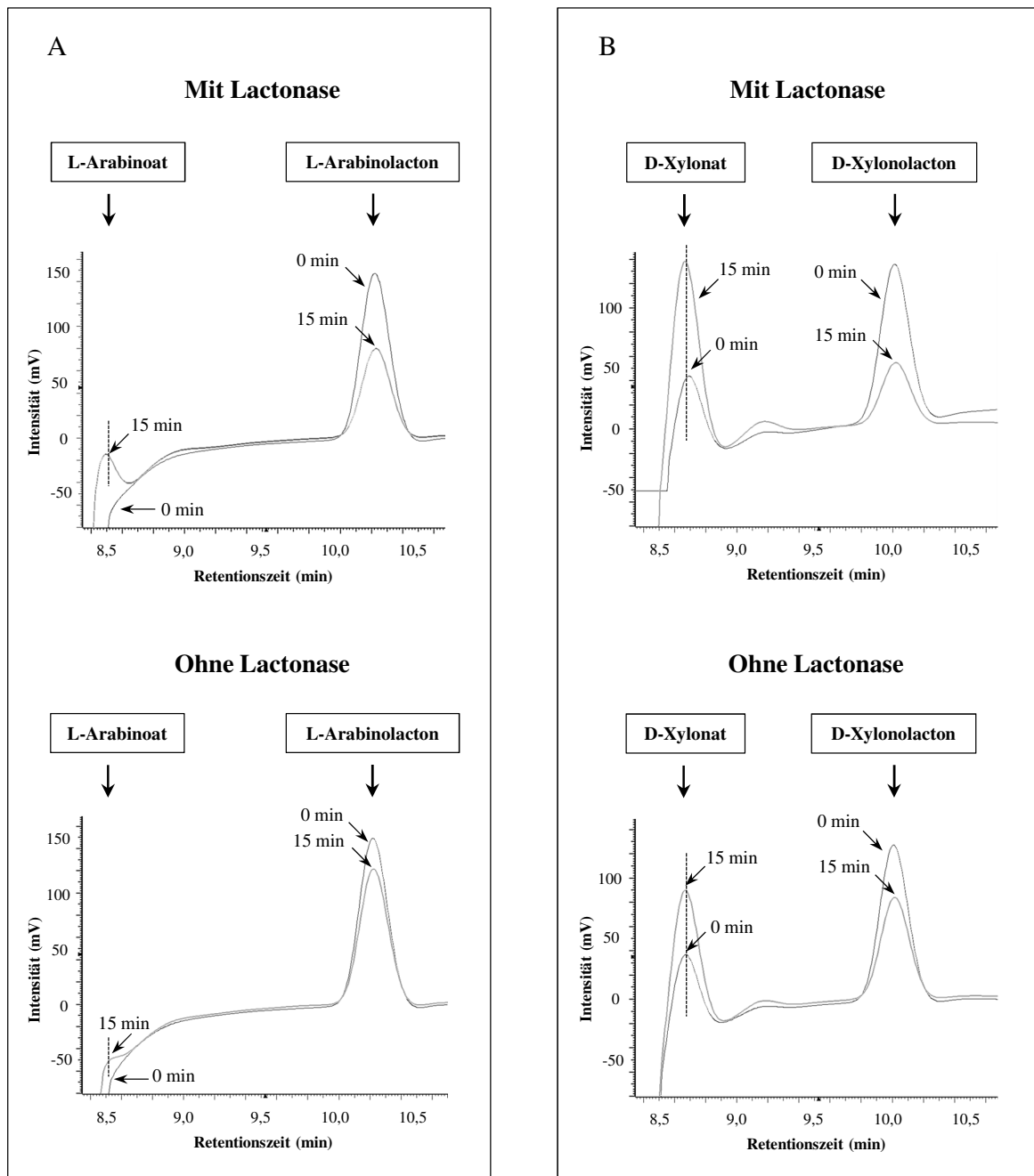


Abbildung 10 Umsetzung von L-Arabinolacton zu L-Arabinooat (A) und von D-Xylonolacton zu D-Xylonat (B) durch die D-Xylono-/L-Arabinolactonase (HVO_B0030) aus *H. volcanii*. Die Proben wurden mittels HPLC analysiert, dabei wurde eine Nucleodursäule mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min und einem RI-Detektor verwendet. Es sind je Probe zwei übereinandergelagerte Chromatogrammausschnitte abgebildet. Die Abbildung (A) zeigt die Hydrolyse des L-Arabinolactons mit der Lactonase und die spontane Hydrolyse ohne Lactonase zu Beginn der Reaktion ($t = 0$ min) und nach 15 min. Die Abbildung (B) zeigt die Hydrolyse des D-Xylonolactons mit der Lactonase und die spontane Hydrolyse ohne Lactonase zu Beginn der Reaktion ($t = 0$ min) und nach 15 min. Retentionszeiten der Standards: L-Arabinolacton (10,22 min), L-Arabinooat (8,47 min), D-Xylonolacton (10,01 min), D-Xylonat (8,67 min). Die gebildeten Produkte sind durch eine gestrichelte Linie markiert.

Die Aktivität der rekombinanten Lactonase mit L-Arabinolacton und D-Xylonolacton konnte auch mit Hilfe des p-Nitrophenol Tests gezeigt werden, wobei die Freisetzung von Protonen bestimmt wird, die bei der Hydrolyse der Lactone entstehen. Die Protonierung von p-Nitrophenol wurde als eine Abnahme der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen, so dass die Enzymaktivitäten der Lactonase als eine Extinktionsänderung pro min und mg Protein ($\Delta E/\text{min mg}^{-1}$) angegeben wurden. Mit diesem Test wurden die Substratspezifität für unterschiedliche Lactone und deren kinetischen Konstanten bestimmt, sowie die Abhängigkeit von KCl und divalenten Kationen untersucht. Wie in dem HPLC System gezeigt, katalysierte die Lactonase die Hydrolyse des L-Arabinolactons und des D-Xylonolactons, dabei wurden bei der Umsetzung von L-Arabinolacton apparente K_m - und V_{\max} -Werte von 13,8 mM und $38,1 \Delta E/\text{min mg}^{-1}$ und bei der Hydrolyse des D-Xylonolactons von 12,4 mM und $17,7 \Delta E/\text{min mg}^{-1}$ bestimmt. Außer diesen Lactonen katalysierte die Lactonase auch die Umsetzung von D-Galactonolacton sowie D-Gluconolacton (Abbildung 11). Das D-Galactonolacton wurde mit apparenten K_m - und V_{\max} -Werten von 11,1 mM und $33 \Delta E/\text{min mg}^{-1}$ umgesetzt. Bei der Hydrolyse von D-Gluconolacton konnte bei einer Konzentration von 15 mM mit etwa $50 \Delta E/\text{min mg}^{-1}$ die höchste Enzymaktivität bestimmt werden. Allerdings folgte die Umsetzung des D-Gluconolactons nur bis zu einer Konzentration von 15 mM einer Michaelis Menten Kinetik, höhere Konzentrationen führten zu einer Abnahme der Aktivität, weshalb keine K_m - und V_{\max} -Werte angegeben wurden. Das D-Ribonolacton diente nicht als Substrat. Die Ergebnisse zeigen, dass die Lactonase ein breites Substratspektrum aufweist. Die Aktivität der Lactonase zeigte eine Abhängigkeit von KCl, so wurden bei der Umsetzung von 10 mM L-Arabinolacton die höchsten Enzymaktivitäten bei KCl Konzentrationen von >1 M gemessen. Außerdem zeigte das Enzym eine strikte Abhängigkeit von divalenten Kationen, bei der Hydrolyse von 10 mM L-Arabinolacton wurden für MgCl_2 apparente K_m - und V_{\max} -Werte von 0,2 mM und $12,9 \Delta E/\text{min mg}^{-1}$ bestimmt (Abbildung 12). Das MgCl_2 ($8,1 \Delta E/\text{min mg}^{-1} = 100\%$) konnte bei einer Konzentration von 1 mM effektiv durch andere divalente Kationen ersetzt werden, dabei wurde es durch CoCl_2 (150 %) und MnCl_2 (86 %) gut ersetzt, während FeCl_2 (21 %), NiCl_2 (21 %) und ZnCl_2 (14 %) das MgCl_2 nur in einem geringeren Ausmaß ersetzen konnten. Die kinetischen Parameter der rekombinanten Lactonase sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

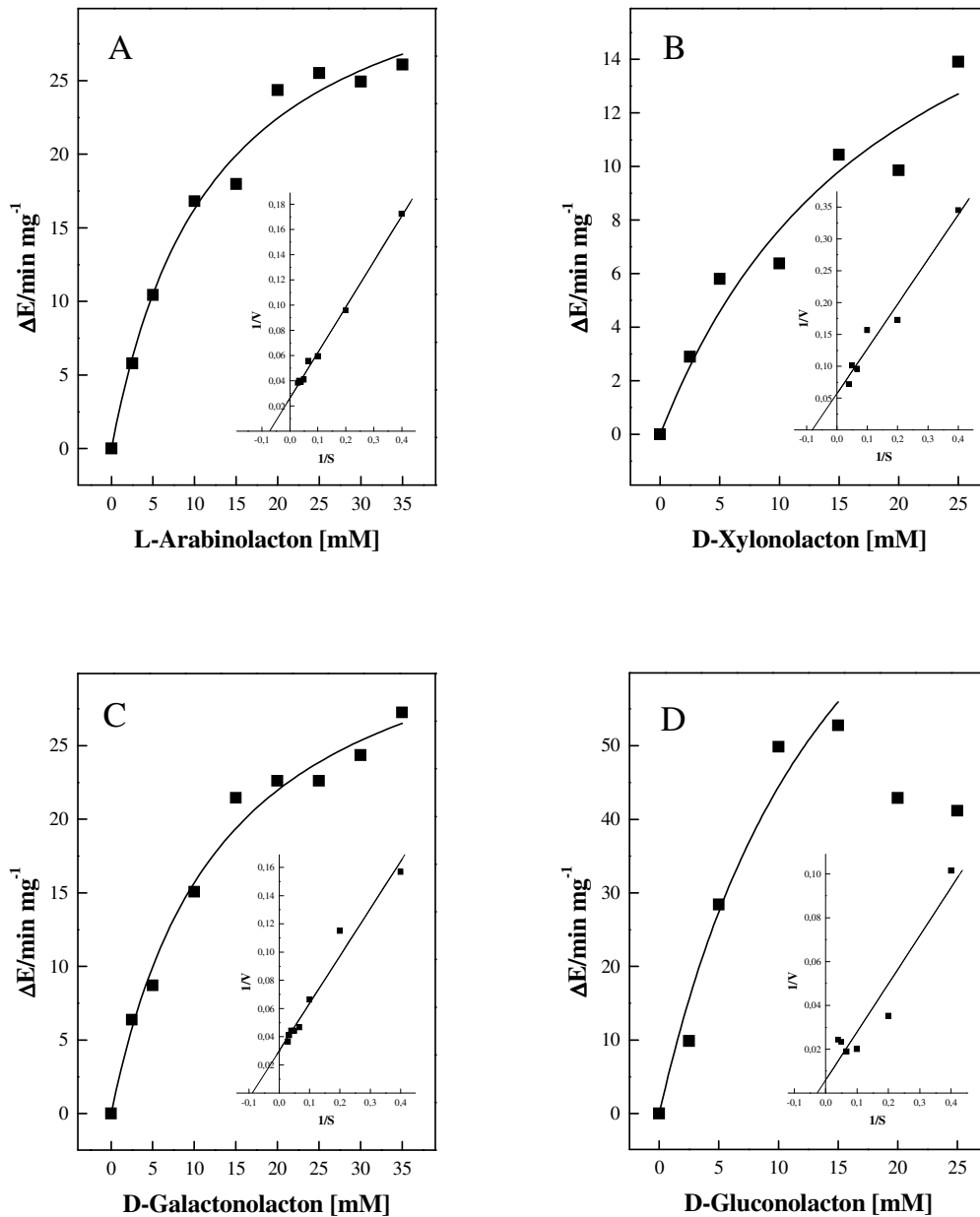


Abbildung 11 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten D-Xylono-/L-Arabinolactonase (HVO_B0030) aus *H. volcanii* von der Substratkonzentration. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an L-Arabinolacton (A), D-Xylonolacton (B), D-Galactonolacton (C) und D-Gluconolacton (D). Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt, die in Einschüben dargestellt sind.

Die Charakterisierung der rekombinanten Lactonase hat ergeben, dass das Enzym neben L-Arabinolacton und D-Xylonolacton, auch D-Galactonolacton und D-Gluconolacton umsetzt und eine strikte Abhängigkeit von divalenten Kationen zeigte.

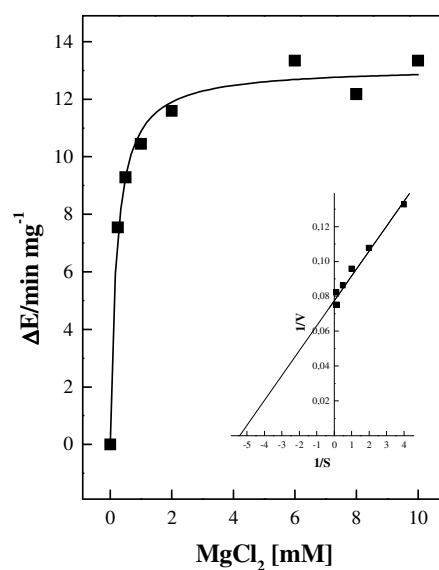


Abbildung 12 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten D-Xylono-/L-Arabino-lactonase (HVO_B0030) aus *H. volcanii* von MgCl_2 . Dargestellt ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an MgCl_2 . Die apparenten K_m - und V_{\max} -Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt, die in Einschüben dargestellt sind.

Tabelle 7 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten Lactonase (HVO_B0030) aus *H. volcanii*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 42 °C mittels p-Nitrophenol Test bestimmt. * höchste bestimmte Enzymaktivität

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		28
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) ¹		35
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) ²		32,3
Oligomere Struktur		α ₁
Apparenter V _{max} (ΔE/min mg ⁻¹)	L-Arabinolacton	38,1
	D-Xylonolacton	17,7
	D-Galactonolacton	33
	D-Gluconolacton	50*
Apparenter K _m (mM)	L-Arabinolacton	13,8
	D-Xylonolacton	12,4
	D-Galactonolacton	11,1
Divalente Kationen [1 mM]	MgCl ₂ (100 %), CoCl ₂ (150 %), MnCl ₂ (86 %), FeCl ₂ (21 %), NiCl ₂ (21 %), ZnCl ₂ (14 %)	

¹ Bestimmung mittels SDS-PAGE, ² Halolex (www.halolex.mpg.de/public/) und Protparam (web.expasy.org/protparam/)

5.1.1.4 Herstellung und Analyse einer Deletionsmutante der Lactonase

Da die Lactonase (HVO_B0030) pentosespezifisch induziert wird und die Umsetzung von D-Xylonolacton und L-Arabinolacton katalysiert, wurde sie D-Xylono-/L-Arabinolactonase (XANL) genannt. Um zu prüfen, ob die Lactonase XANL für das Wachstum von *H. volcanii* auf den Pentosen essentiell ist, wurde eine chromosomale Deletionsmutante von HVO_B0030 hergestellt und analysiert. Dazu wurden das Plasmid pTA131- Δ HVO_B0030, das als Insert ein deletiertes HVO_B0030 Gen mit flankierenden 5' und 3' Sequenzen enthielt, und die sogenannte pop-in/pop-out Methode verwendet (Allers et al. 2004; Bitan-Banin et al. 2003). Das Plasmid wurde zunächst über homologe Rekombination ins Genom von *H. volcanii* integriert und anschließend mittels 5-FOA auf den Verlust des zuvor integrierten Plasmids selektiert. In der Deletionsmutante $\Delta xanl$ wurden 735 bp von HVO_B0030 deletiert, dies entspricht 84 % des Gens. Die erfolgreiche Deletion wurde mittels Southern Blot verifiziert (Abbildung 13).

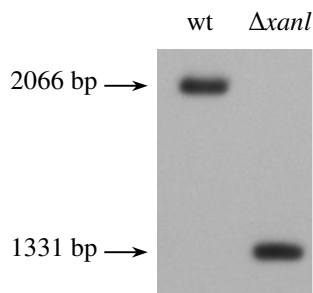


Abbildung 13 Southern Blot Analyse zur Überprüfung der Gendeletion von *xanl* (HVO_B0030) in *H. volcanii*. Die DNA aus dem Wildtyp (wt) und aus der Deletionsmutante ($\Delta xanl$) wurde mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut, die Fragmente der Größe nach getrennt und auf eine Membran geblottet. Es wurde eine Sonde eingesetzt, die spezifisch an dem 5'-upstream Bereich von *xanl* binden konnte. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereiches von *xanl*.

Das Wachstum der Deletionsmutante der D-Xylono-/L-Arabinolactonase (XANL) wurde auf 25 mM D-Xylose und L-Arabinose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Dabei zeigte der Wildtyp beim Wachstum auf L-Arabinose eine Wachstumsrate $\mu = 0,072 \text{ h}^{-1}$ und eine maximale optische Dichte (ΔOD_{600}) von 2,8. Die Deletion von *xanl* (HVO_B0030) führte beim Wachstum auf L-Arabinose zu einer geringeren Wachstumsrate ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$) sowie einer geringeren maximalen optischen Dichte

($\Delta OD_{600} = 2,2$). Durch eine *in trans* Komplementation mit Hilfe des Plasmids pTA963-HVO_B0030 konnte der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden (Abbildung 14). Die Daten sprechen für eine funktionelle Beteiligung von XANL am Wachstum auf L-Arabinose, dagegen zeigte die Deletionsmutante beim Wachstum auf D-Xylose kein Phänotyp.

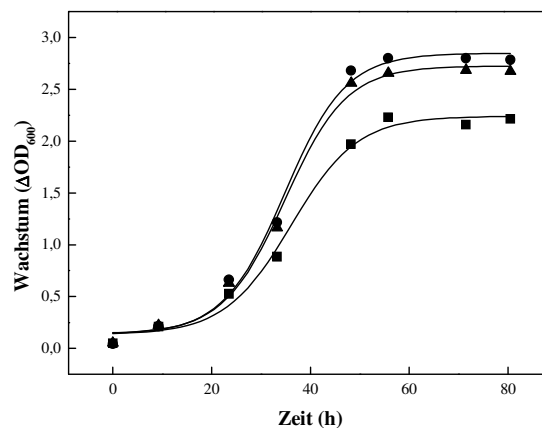


Abbildung 14 Wachstum von *H. volcanii* $\Delta xanl$ auf 25 mM L-Arabinose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dargestellt ist das Wachstum der *xanl* Deletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und des mit *xanl* komplementierten $\Delta xanl$ -Stammes (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casamino säuren angezogen. Die Messung des Wachstums erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass HVO_B0030 einer pentosespezifischen transkriptionellen Regulation unterliegt. Außerdem katalysieren die ersten Dehydrogenasen des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus die Umsetzung der Pentosen zu D-Xylonolacton beziehungsweise L-Arabinolacton. Die Umsetzung dieser Lactone zu den entsprechenden Säuren wird durch die Lactonase, kodiert von HVO_B0030, katalysiert. Diese Ergebnisse sprechen für die funktionelle Beteiligung der Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii*.

5.1.2 Transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus

Detaillierte Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* liegen noch nicht vor. Im Folgenden wird zunächst die transkriptionelle Induktion der Gene des Pentoseabbaus untersucht. Anschließend wurde die Beteiligung des Transkriptionsregulators XacR an dieser Regulation untersucht.

5.1.2.1 Transkriptanalysen der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus

Die Transkripte aller am D-Xylose- und L-Arabinoseabbau beteiligten Gene, HVO_B0032, HVO_B0038A, HVO_B0027/HVO_B0028 und HVO_B0039, die für die L-Arabinose-Dehydrogenase, die D-Xylonat-Dehydratase, die 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase/D-Xylose-Dehydrogenase und die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodieren, wurden mittels Northern Blot oder RT-PCR analysiert. Der Northern Blot mit einer spezifischen Sonde für HVO_B0032 zeigte ein starkes Signal in D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen, jedoch nicht in D-Glucose gewachsenen Zellen (Abbildung 15A). Die Transkriptgröße von etwa 1000 nt entspricht der Länge von HVO_B0032 (765 bp) und der bereits identifizierten Länge des 3'-untranslatierten Bereiches (3'-UTR) von 205 nt (Johnsen et al. 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Lactonase, kodiert von HVO_B0030, wurde beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose transkriptionell induziert, nicht jedoch beim Wachstum auf D-Glucose (Abbildung 6). Auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit des Gens HVO_B0038A und HVO_1488 (85 %) wurde die transkriptionelle Regulation von HVO_B0038A mittels RT-PCR nachgewiesen. Es zeigte sich, dass ein spezifisches PCR-Produkt nur in D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen nachweisbar war, jedoch nicht in D-Glucose gewachsenen Zellen (Abbildung 15B). Transkriptanalysen von HVO_B0027 ergaben im Northern Blot in D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen jeweils zwei Signale, ein starkes Signal von 2000 nt entspricht dem Operon HVO_B0027/HVO_B0028 und ein schwächeres Signal von 1000 nt entspricht der Größe von HVO_B0027 (870 bp). In D-Glucose gewachsenen Zellen konnten diese Transkripte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 15C). Mit einer spezifischen Sonde für HVO_B0039 wurde ein Signal bei etwa 1700 nt in D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen Zellen nachgewiesen, dies entspricht etwa der Größe von HVO_B0039 (1449 bp), während in D-Glucose gewachsenen Zellen nur ein schwaches Signal detektiert wurde (Abbildung 15D).

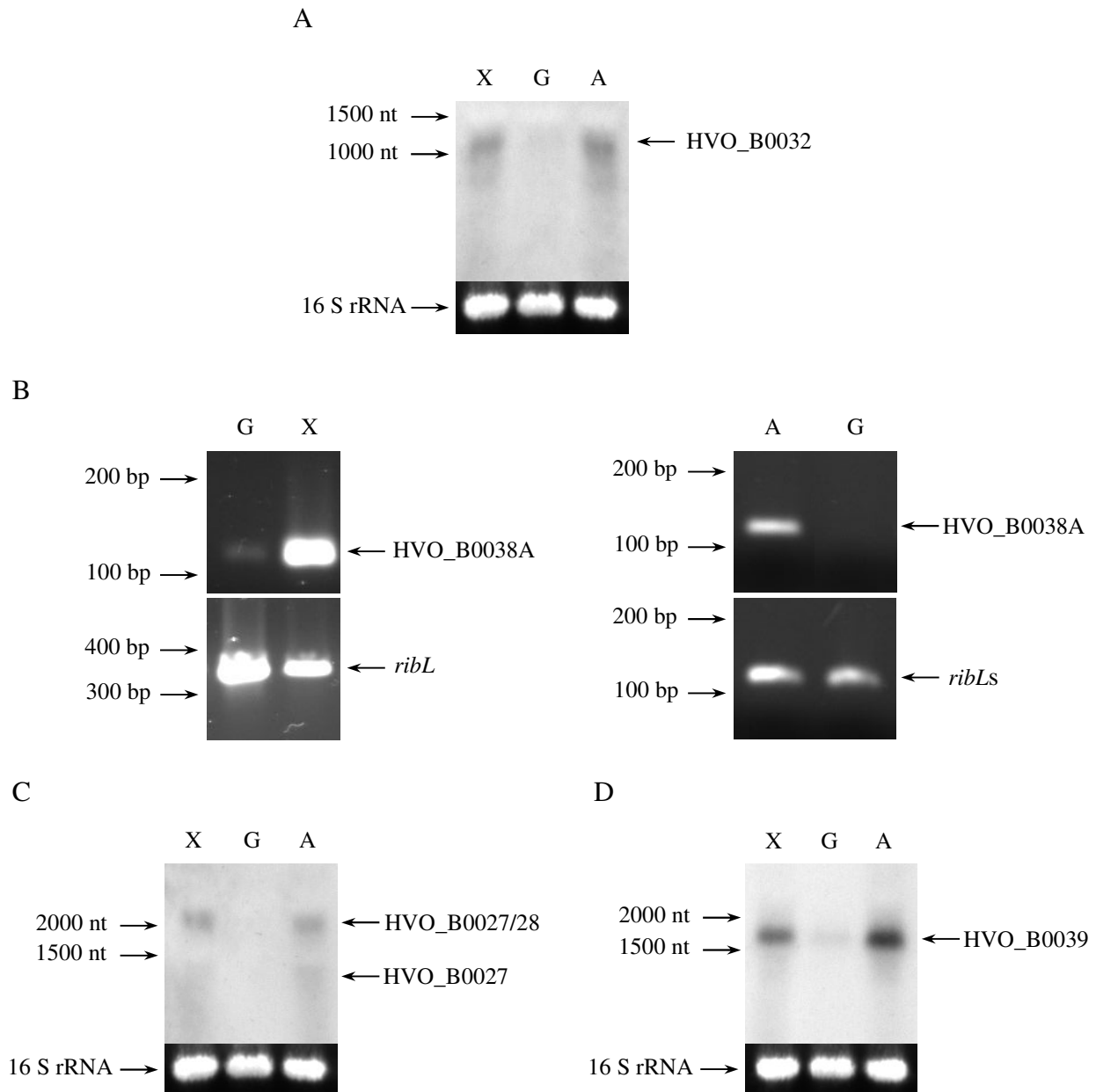


Abbildung 15 Transkriptionsanalysen der Gene HVO_B0032 (A), HVO_B0038A (B), HVO_B0027 (C) und HVO_B0039 (D) aus *H. volcanii*. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die auf D-Xylose (X), D-Glucose (G) oder L-Arabinose (A) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Die Transkripte von HVO_B0032, HVO_B0027 und HVO_B0039 wurden mittels Northern Blot analysiert, die Sonden waren spezifisch für das jeweilige Gen. Die 16 S rRNA diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels mit RNA und wurde durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Das Transkript von HVO_B0038A wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Die PCR wurde mit HVO_B0038A spezifischen Primern (Fragmentgröße 112 bp) durchgeführt. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein *ribL* (Brenneis et al. 2007) (*ribL* Fragmentgröße 337 bp oder *ribLs* Fragmentgröße 128 bp) verwendet.

Zusammenfassend zeigen die Transkriptanalysen, dass alle bisher identifizierten Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* sowohl beim Wachstum auf D-Xylose als auch auf L-Arabinose transkriptionell induziert werden. Dies deutet auf eine gemeinsame transkriptionelle Regulation der Gene beider Abbauewege hin.

5.1.2.2 HVO_B0040 kodiert für einen Transkriptionsregulator (XacR) des Pentoseabbaus

Neben den Genen des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus liegt das Gen HVO_B0040, das für einen hypothetischen Transkriptionsregulator kodiert (Abbildung 5). Bioinformatische Analysen ergaben, dass der Regulator eine große Ähnlichkeit zu den Transkriptionsregulatoren der bakteriellen IclR-Proteinfamilie aufweist. Erste Transkriptanalysen des hypothetischen Transkriptionsregulators, kodiert von HVO_B0040, zeigten eine transkriptionelle Induktion beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose, jedoch nicht beim Wachstum auf D-Glucose. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Deletionsmutante dieses Gens zu einem Verlust des Wachstums auf den Pentosen, nicht jedoch auf D-Glucose führte. Dies deutet auf eine Beteiligung des hypothetischen Transkriptionsregulators am Pentosekatabolismus hin, weshalb das von HVO_B0040 kodierte Protein, XacR (D-xylose and L-arabinose catabolism regulator) genannt wurde (AG Schönheit).

Um zu prüfen, ob der pentosenegative Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante von *xacR* ausschließlich auf das Fehlen von XacR zurückzuführen ist, wurde die Deletionsmutante $\Delta xacR$ *in trans* mit HVO_B0040 komplementiert. Die *xacR* Deletionsmutante zeigte im Gegensatz zum Wildtyp kein Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose (Abbildung 16). Durch eine *in trans* Komplementation mit dem Plasmid pTA963-HVO_B0040 konnte die Deletionsmutante wieder auf D-Xylose und L-Arabinose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, so dass der pentosenegative Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante nur auf das Fehlen von XacR zurückzuführen war.

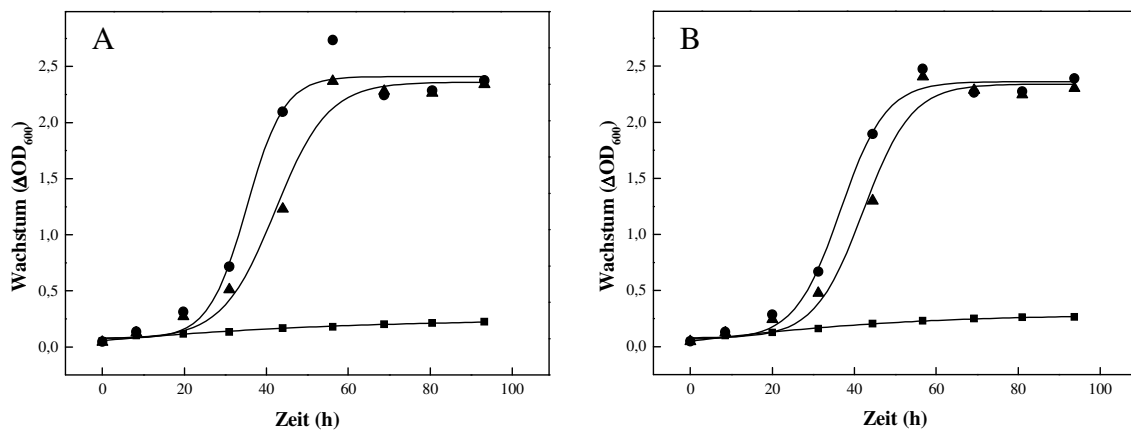


Abbildung 16 Wachstum der Deletionsmutante $\Delta xacR$ von *H. volcanii* auf 25 mM D-Xylose (A) und 25 mM L-Arabinose (B) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dargestellt ist das Wachstum der *xacR* Deletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und des mit *xacR* komplementierten $\Delta xacR$ -Stammes (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminsäuren gezogen. Die Messung des Wachstums erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm.

5.1.2.3 XacR ist ein transkriptioneller Aktivator der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus

Um eine Beteiligung von XacR an der transkriptionellen Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* zu zeigen, wurden die Transkriptbildung dieser Gene sowie einige pentosespezifische Enzymaktivitäten im Wildtyp *H. volcanii* H26 und der Deletionsmutante $\Delta xacR$ verglichen. Da die Deletionsmutante $\Delta xacR$ nicht in der Lage ist auf D-Xylose und L-Arabinose zu wachsen, wurden die Stämme auf Medium mit 5 mM D-Glucose bis zum Beginn der stationären Phase angezogen. Danach wurden Aliquots der Zellen für die RNA Isolierung und die Messung der Enzymaktivitäten durch Zentrifugation geerntet (0 h), den restlichen Zellen wurde 5 mM D-Xylose oder L-Arabinose hinzugegeben, um die Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus zu induzieren. Nach zwei Stunden weiteren Wachstums wurden induzierte Zellen für die RNA Isolierung geerntet (2 h), die Zellen für Messungen der Enzymaktivitäten wurden 8 bis 27 h nach der Induktion geerntet. Die Transkripte der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus, HVO_B0032, HVO_B0030, HVO_B0027/HVO_B0028 und HVO_B0039 wurden mittels Northern Blot analysiert, während das Transkript von HVO_B0038A mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (siehe 5.1.2.1). Die Länge dieser Transkripte entsprach den Transkriptlängen von pentoseadaptierten Zellen (Abbildung 15 und Abbildung 6). Vor der Zugabe von D-Xylose

beziehungsweise L-Arabinose (0 h), waren keine Transkripte der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus im Wildtyp oder der Deletionsmutante $\Delta xacR$ nachweisbar. Zwei Stunden nach der Zugabe von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose (2 h) wurde im Wildtyp eine transkriptionelle Induktion dieser Gene gezeigt. Im Gegensatz dazu wurden in der Deletionsmutante $\Delta xacR$ keine Transkripte dieser Gene nach der Zugabe der Pentosen nachgewiesen (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Neben den Transkriptanalysen wurden auch die Enzymaktivitäten von zwei pentosespezifischen Enzymen, der AraDH und der KGSADH, in den Zellen des Wildtyps und der Deletionsmutante bestimmt. Vor der Zugabe der Pentosen betrugen die Aktivitäten der AraDH und der KGSADH im Wildtyp und der Deletionsmutante 5 mU/mg beziehungsweise 6 mU/mg. Nach der Zugabe von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose wurde ein Anstieg der Aktivitäten der AraDH in Wildtyp Zellen innerhalb von 27 h auf 480 beziehungsweise 650 mU/mg und der Aktivitäten der KGSADH auf 150 beziehungsweise 300 mU/mg gemessen. Diese Zunahme der Enzymaktivität wurde in der Deletionsmutante $\Delta xacR$ nicht nachgewiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Transkriptionsregulator XacR essentiell für die pentosespezifische transkriptionelle Aktivierung der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus ist sowie für die Induktion der entsprechenden Enzymaktivitäten.

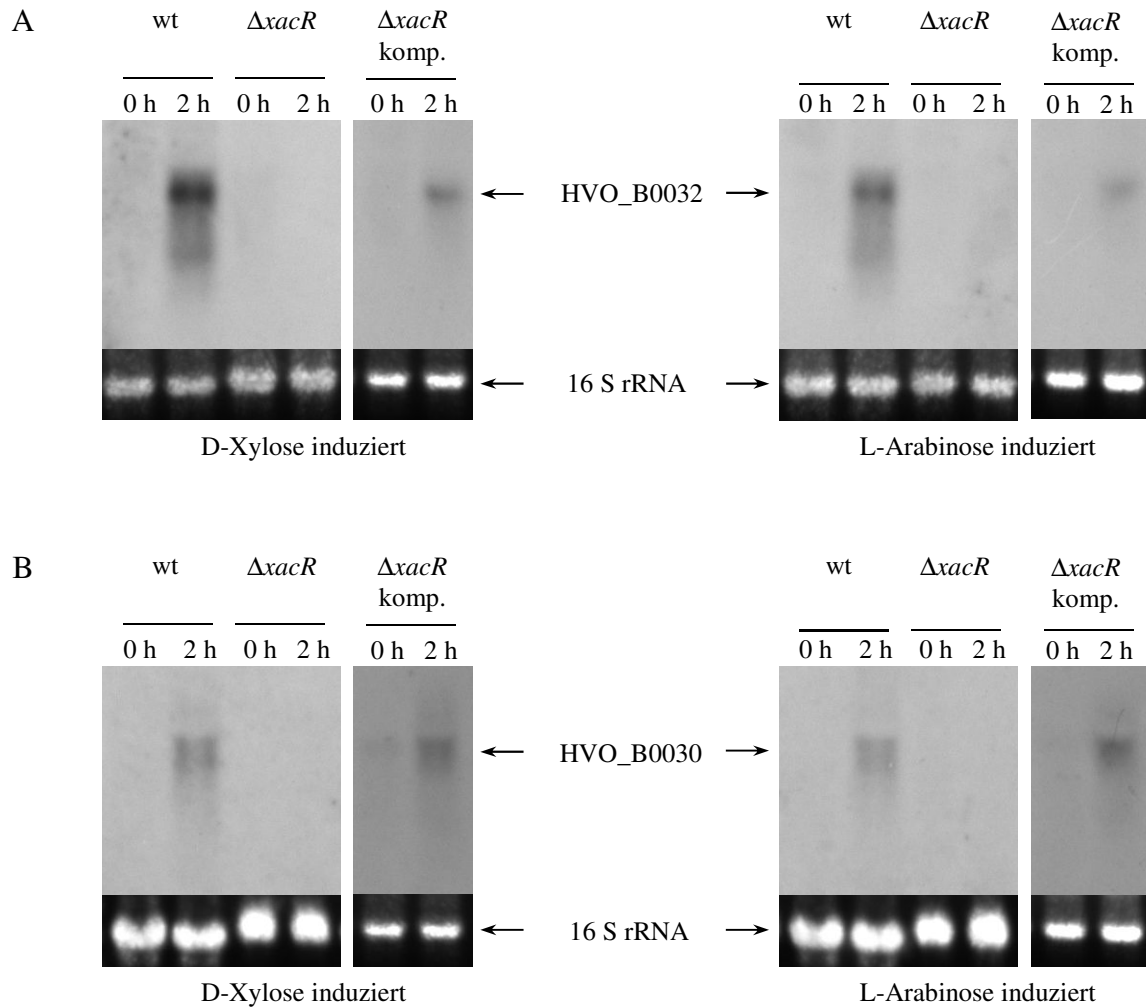


Abbildung 17 Transkriptionsanalysen der L-Arabinose-Dehydrogenase (HVO_B0032) (A) und D-Xylono-/L-Arabinolactonase (HVO_B0030) (B) in *H. volcanii* (wt), der Deletionsmutante von *xacR* ($\Delta xacR$) und der *in trans* komplementierten Deletionsmutante ($\Delta xacR$ komp.). Die Analyse erfolgte mittels Northern Blot. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die auf 5 mM D-Glucose bis zur stationären Phase gewachsen waren (0 h). Anschließend wurde den Zellen 5 mM D-Xylose oder L-Arabinose hinzugegeben und nach zwei Stunden Wachstum (2 h) erneut die RNA isoliert. Die Sonden waren spezifisch für HVO_B0032 beziehungsweise HVO_B0030. Die 16 S rRNA diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels mit RNA und wurde durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

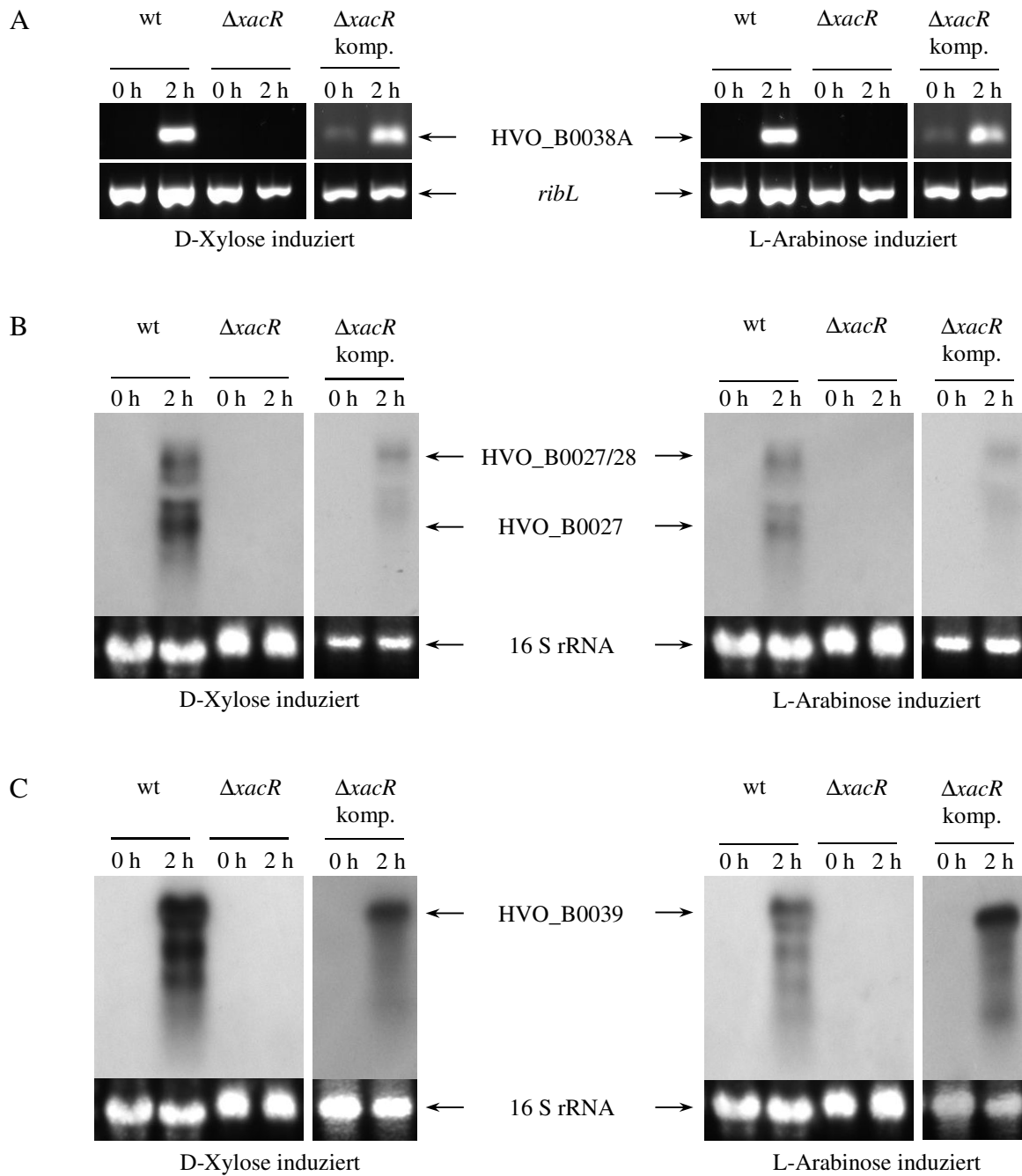


Abbildung 18 Transkriptionsanalysen der D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A) (A), der 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0027) (B) und der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (HVO_B0039) (C) in *H. volcanii* (wt), der Deletionsmutante von *xacR* ($\Delta xacR$) und der komplementierten Deletionsmutante ($\Delta xacR$ komp.). Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR oder Northern Blot. Die RNA wurde aus Zellen isoliert, die auf 5 mM D-Glucose bis zur stationären Phase gewachsen waren (0 h). Anschließend wurde den Zellen 5 mM D-Xylose oder L-Arabinose hinzugegeben und nach zwei Stunden Wachstum (2 h) erneut die RNA isoliert. Das Transkript von HVO_B0038A wurde mittels RT-PCR und spezifischen Primern (Fragmentgröße 112 bp) nachgewiesen. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein *ribL* (Fragmentgröße 337 bp) verwendet (Brenneis et al. 2007). Die Transkripte von HVO_B0027 und HVO_B0039 wurden mittels Northern Blot und jeweils spezifischen Sonden nachgewiesen. Die 16 S rRNA diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung des Gels mit RNA und wurde durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Um zu prüfen, ob die transkriptionelle Aktivierung der Gene des Pentoseabbaus ausschließlich durch XacR induziert wird oder ob zusätzlich die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose benötigt werden, wurden die Transkripte dieser Gene in Komplementationsansätzen in Abwesenheit und in Gegenwart der Pentosen analysiert (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Komplementationsansätze wurden mit dem Plasmid pTA963-HVO_B0040, das für *xacR* unter der Kontrolle eines induzierbaren Tryptophanase Promotors kodiert, durchgeführt. Unter diesen Bedingungen führte ein Wachstum mit Tryptophan zu einer pentoseunabhängigen, konstitutiven Expression von XacR. Diese wurde mittels RT-PCR und *xacR* spezifischen Primern nachgewiesen (Abbildung 19). Dabei konnte ein *xacR* spezifisches PCR-Produkt sowohl in Abwesenheit der Pentosen (0 h), als auch zwei Stunden nach der Zugabe von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose (2 h) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten die Transkripte der Gene des Pentoseabbaus in dem Komplementationsstamm nur in Anwesenheit der Pentosen nachgewiesen werden (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Daten deuten darauf hin, dass für die XacR abhängige Aktivierung der Gene des Pentoseabbaus auch die Gegenwart der Pentosen essentiell ist.

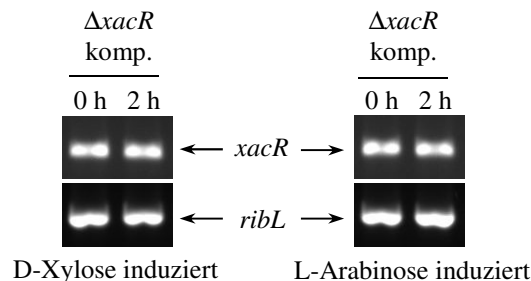


Abbildung 19 Transkriptionsanalysen von XacR (HVO_B0040) in der komplementierten Deletionsmutante ($\Delta xacR$ komp.). Die PCR wurde mit *xacR* spezifischen Primern (Fragmentgröße 308 bp) durchgeführt. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein *ribL* (Brenneis et al. 2007) (Fragmentgröße 337 bp) verwendet.

5.1.2.4 Identifizierung eines Bereiches zur transkriptionellen Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass XacR ein transkriptioneller Aktivator für die Gene des Pentoseabbaus in Gegenwart von D-Xylose und L-Arabinose darstellt. Transkriptionsaktivatoren binden in der Regel an archaeellen Promotoren stromaufwärts der TATA-Box und des BRE (TFB recognition element) an „upstream activator sequences“ (UAS). Um einen solchen Bereich für den Transkriptionsaktivator XacR zu identifizieren, wurden Promotoranalysen des Gens HVO_B0038A, das für die D-Xylonat-Dehydratase (XAD) kodiert, durchgeführt. Dazu wurde zunächst der Transkriptionsstart der XAD durch die Methode cr-RT-PCR bestimmt, dabei wird neben der 5'-UTR auch die 3'-UTR der Transkripte bestimmt (Kuhn and Binder 2002; Brenneis et al. 2007). Es wurde 5' und 3' ligierte gesamt mRNA aus D-Xylose und L-Arabinose gewachsenen *H. volcanii* Zellen mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und ein PCR-Produkt von HVO_B0038A mit zwei spezifischen Primern so amplifiziert, dass sich die ligierten Enden des Transkriptes auf dem amplifizierten cDNA Fragment befanden. Anschließend wurde das PCR-Produkt über „AT-cloning“ in den pDrive Vektor kloniert und insgesamt 30 Klone sequenziert. Die 5'- und 3'- Enden wurden durch einen Vergleich der Sequenzierung mit einer Datenbank (Halolex) bestimmt.

Das 5'-Ende des Transkriptes von HVO_B0038A befindet sich 3 bp stromaufwärts des annotierten Translationsstartkodons ATG (Abbildung 20). Stromaufwärts des Transkriptionsstartes (TSS, +1) konnte eine konservierte TATA-Box bei etwa -27 bp identifiziert werden, außerdem wurde ein potentiell „ww Motiv“ bei -11 bp/-10 bp markiert. Das „ww Motiv“ wurde in Haloarchaea als basales Promotorelement identifiziert, das häufig aus den Basen Adenin und/ oder Thymin besteht und vermutlich essentiell für die Bindung von TFB oder der RNA-Polymerase ist (Brenneis et al. 2007). Neben dem TSS wurde auch das 3'-Ende des Transkripts bestimmt, dabei zeigte die 3'-UTR eine variable Länge, eine Vielzahl der Transkripte zeigte eine Länge von 137 bp stromabwärts des Stopkodons TAA. Am Ende des Transkripts konnte eine Sequenz aus vier Uracil Basen identifiziert werden, die vermutlich für die Termination der Transkription benötigt wird, wie es für eine poly-Uracil Basensequenz in zwei Haloarchaea gezeigt wurde (Brenneis et al. 2007).

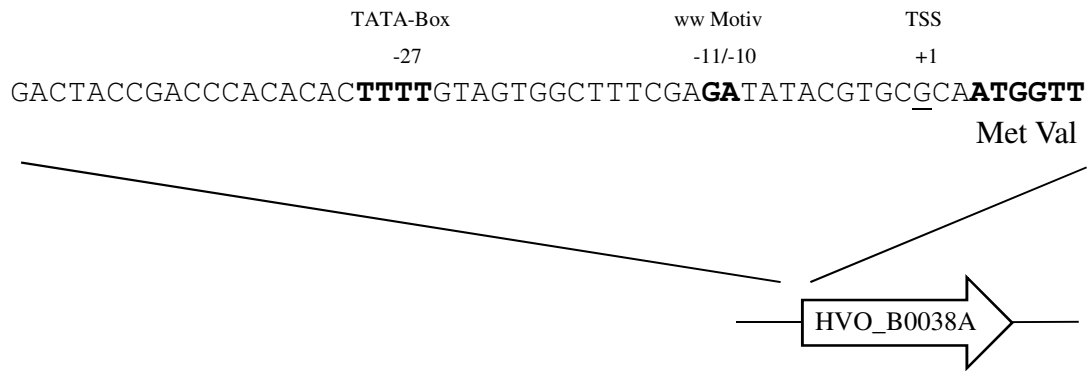


Abbildung 20 Schematische Darstellung des 5'-Endes der D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A) aus *H. volcanii*. Das 5'-Ende wurde mit Hilfe von zirkularisierter mRNA und einer RT-PCR bestimmt. Der Transkriptionsstart (TSS) ist durch +1 gekennzeichnet. Die zwei ersten kodierenden Triplets sind durch fette Buchstaben markiert und die jeweils kodierten Aminosäuren sind darunter dargestellt. Die TATA-Box befindet sich zwischen -26 und -29 bp stromaufwärts des TSS und ist ebenfalls durch fette Buchstaben hervorgehoben. Das potentielle ww Motiv bei den Basenpaaren -11/-10 ist ebenfalls fett markiert.

Für die Identifizierung eines möglichen Bereiches, der für die pentosespezifische Aktivierung der Gene des Pentoseabbaus benötigt wird, wurden verschiedene Deletionskonstrukte des Promotors von HVO_B0038A hergestellt. Dafür wurde ein *bgaH*-Reportersystem verwendet, womit Promotoraktivitäten von Genen in Transformanten, nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, über die Aktivität einer halophilen β -Galaktosidase bestimmt werden können (T. Allers, Nottingham, UK). Dazu wurden mittels PCR verschieden lange Promotor-Fragmente amplifiziert, die stromaufwärts des TSS unterschiedlich weit in den Promotor-Bereich reichten und stromabwärts des TSS 14 Codons der XAD enthielten. Die Promotor-Fragmente wurden in den Vektor pTA919 *in frame* vor das *bgaH*-Reportergen kloniert und die Konstrukte in *H. volcanii* H555 transformiert. Die β -Galaktosidase Aktivität der verschiedenen *H. volcanii* H555-Transformanten wurde nach Wachstum auf D-Xylose, L-Arabinose oder Casamminosäuren bestimmt.

Es wurden Fragmente des Promotors von HVO_B0038A mit Längen von 15 bp bis 162 bp, vom Transkriptionsstart (TSS) ausgehend, gemessen (Abbildung 21). Die Promotorfragmente (pUJ28-42, pUJ28-47, pUJ28-54 und pUJ28-162) mit Längen von 42 bp bis 162 bp zeigten beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose β -Galaktosidase Aktivitäten von 1544 ± 402 mU/mg (100 %), im Gegensatz dazu wiesen die Casamminosäuren gewachsenen Kulturen eine basale Rate von 10 – 16 % der induzierten Rate auf. Mit 42 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts enthielt pUJ28-42 den kürzesten aktiven und analysierten Promotor von HVO_B0038A. Eine Verkürzung dieses Fragmentes um 4 bp (pUJ28-38) führte zu einem

Verlust der Aktivität von etwa 50 %, eine weitere Verkürzung um 7 bp (pUJ28-31) führte zu einer Aktivität von unter 1 %, dabei wies dieses Fragment noch eine intakte TATA-Box auf. Die Transformanten mit dem Plasmid pUJ28-15 zeigten weder nach Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose noch nach Wachstum auf Casaminosäuren eine messbare Aktivität. Bei diesem Konstrukt wurde der Promotor von HVO_B0038A so weit deletiert, dass auch die basalen Promotorelemente, bestehend aus TATA-Box und BRE, nicht mehr vollständig vorhanden waren.

Im Rahmen einer Masterarbeit (Anne-Christine Schulz, 2014) wurde der Promotor von HVO_B0038A mit Hilfe von Mutationsexperimenten weiter analysiert. Dabei konnten vier Nukleotide (GACC) identifiziert werden, die an der XacR Bindung beteiligt sein könnten.

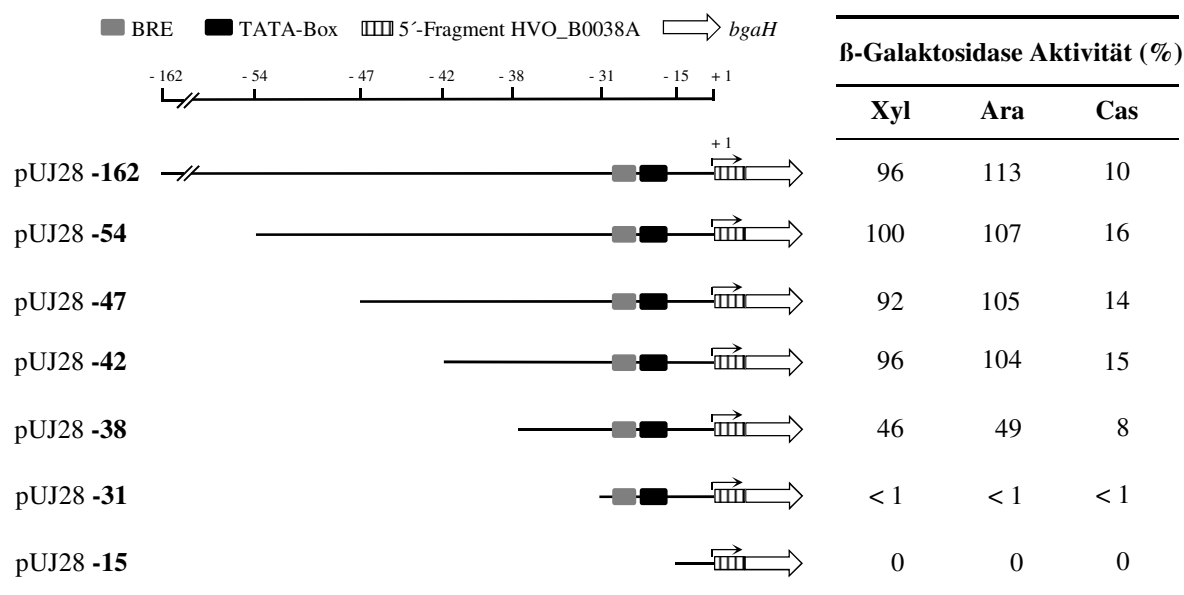


Abbildung 21 Promotoranalyse der D-Xylonat-Dehydratase aus *H. volcanii* mittels *bgaH*-Reportergenfusion. Schematische Darstellung der unterschiedlich langen Promotor-*bgaH*-Konstrukte. Dargestellt sind das BRE-Element, die TATA-Box, Transkriptionsstart +1, der 5'-Bereich des Gens HVO_B0038A und die β-Galaktosidase (*bgaH*). Die Zahl neben dem Plasmidnamen (pUJ28) gibt die Länge des amplifizierten XAD Promotors stromaufwärts des Transkriptionsstarts an. Die Tabelle zeigt die β-Galaktosidase Aktivität aus Kulturen, die auf 25 mM D-Xylose (Xyl), 25 mM L-Arabinose (Ara) oder 1 % Casaminosäuren (Cas) gewachsen waren. 100 % entsprechen einer spezifischen Aktivität von 1544 ± 402 mU/mg.

5.1.2.5 XacR ist ein Repressor seiner eigenen Synthese

Bisherige Transkriptanalysen haben ergeben, dass XacR transkriptionell beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose induziert wird (AG Schönheit). Um zu prüfen, ob XacR selbst an dieser Regulation beteiligt ist, wie es für viele Transkriptionsregulatoren der IclR Familie beschrieben wurde, wurde die Promotoraktivität eines *xacR::bgaH*-Reportergenkonstruktes in *H. volcanii* H555 und einer Deletionsmutante von *xacR* verglichen. Um die mögliche homologe Rekombination zwischen dem Reporter-gen und einem homologen Gen in der Deletionsmutante von *xacR* zu verhindern, wurde zunächst *xacR* in dem *H. volcanii* Stamm H555 deletiert.

Die Deletionsmutante *H. volcanii* H555 $\Delta xacR$ wurde mit Hilfe des Plasmids pTA131- Δ HVO_B0040 und der sogenannten pop-in/pop-out Methode hergestellt. Dabei wurden in der Deletionsmutante 696 bp von HVO_B0040 deletiert, was 92 % des Gens entspricht. Die erfolgreiche Deletion wurde mittels Southern Blot verifiziert (Abbildung 22).

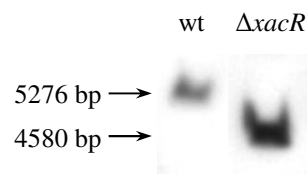


Abbildung 22 Southern Blot Analyse zur Überprüfung der Gendeletion von *xacR* in *H. volcanii* H555. Die DNA aus *H. volcanii* H26 (wt) und aus der Deletionsmutante ($\Delta xacR$) wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut, die Fragmente der Größe nach getrennt und auf eine Membran geblottet. Dabei wurde eine Sonde eingesetzt, die spezifisch an dem 5'-upstream Bereich von *xacR* binden konnte. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereiches von *xacR*.

Zur Erstellung eines *xacR::bgaH*-Reportergenkonstruktes wurde ein Fragment des *xacR* Promotors mittels PCR so amplifiziert, dass das Fragment stromaufwärts des TSS (AG Schönheit) 60 bp weit in den Promotor-Bereich reichte und stromabwärts des TSS 12 Codons von XacR enthielt. Das Promotor-Fragment wurde in den Vektor pTA919 *in frame* vor das *bgaH*-Reportergen kloniert und das Konstrukt (pUJ30-60) in die *H. volcanii* Stämme H555 und H555 $\Delta xacR$ transformiert. Die β -Galaktosidase Aktivität beider transformierter Stämme wurde verglichen. Dazu wurden die *H. volcanii* Stämme H555 und H555 $\Delta xacR$, die jeweils das Plasmid pUJ30-60 trugen, in Medium mit 0,2 % Casaminosäuren für etwa 48 h, bis zum Beginn der stationären Phase ($OD_{600} = 1,1$), angezogen. In einem Aliquot der Kulturen wurde die β -Galaktosidase Aktivität bestimmt, den restlichen Kulturen wurde 5 mM D-Xylose oder L-Arabinose hinzugegeben und nach 120 – 190 h weiteren Wachstums die β -Galaktosidase Aktivität erneut gemessen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 8 angegeben. Das Promotorkonstrukt zeigte im Stamm H555 auf 0,2 % Casaminosäuren eine β -Galaktosidase Aktivität von 620 ± 162 mU/mg, diese wurde zwei- bis dreifach durch die Zugabe von D-Xylose (1814 ± 218 mU/mg) oder L-Arabinose (Einzelexperiment: 1569 mU/mg) erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte die Deletionsmutante in Abwesenheit der Pentosen eine erhöhte Aktivität (1116 ± 251 mU/mg), die sich durch die Zugabe von D-Xylose (1286 ± 372 mU/mg) oder L-Arabinose (1551 mU/mg) nicht signifikant steigern ließ. Die Daten zeigen, dass die erhöhte Aktivität des XacR Promotorkonstruktes in der Deletionsmutante *xacR* von einer Derepression auf Grund des fehlenden XacRs verursacht wird. Auf Grund dieses Ergebnisses wird vermutet, dass die erhöhte XacR Promotoraktivität im Wildtyp nach der Zugabe der Pentosen, sowie die transkriptionelle Aktivierung von XacR von einer pentoseabhängigen Derepression bewirkt wird.

Tabelle 8 Effekt von *xacR* auf *p.xacR::bgaH* in *H. volcanii* H555 und H555 $\Delta xacR$. Die β -Galaktosidase Aktivitäten wurden in Kulturen gemessen, die auf 0,2 % Casamminosäuren in Medium bis zum Beginn der stationären Phase ($OD_{600} = 1,1$), gewachsen waren (Cas), anschließend wurde den Kulturen 5 mM D-Xylose oder L-Arabinose hinzugegeben und nach 120 – 190 h weiteren Wachstums erneut die Aktivität bestimmt (Cas + Xyl und Cas + Ara). * = Bei Cas + Ara handelt es sich um Einzelexperimente.

<i>H. volcanii</i> Stamm	β -Galaktosidase Aktivität (mU/mg)		
	Cas	Cas + Xyl	Cas + Ara*
H555	620 \pm 162	1814 \pm 218	1569
H555 $\Delta xacR$	1116 \pm 251	1286 \pm 372	1551

Transkriptionsrepressoren binden in der Regel so an einen archaeellen Promotor, dass eine Anlagerung des Transkriptionsinitiationskomplexes oder der RNA-Polymerase verhindert wird und es somit zu keiner Transkription des Zielgenes kommen kann. Dabei finden diese Bindungen in der Regel zwischen dem Transkriptionsstart und der TATA-Box statt. Bei der Analyse der *xacR* Promotorsequenz konnte ein „inverted repeat“ identifiziert werden [GATacTTx₇AAtaATC], das sich zwischen dem Transkriptionsstart und der TATA-Box befindet. Um zu prüfen, ob es sich bei dieser Sequenz um eine mögliche Repressorbindestelle handelt, wurden zwei Mutanten des Plasmides pUJ30-60 hergestellt, in denen jeweils eine Hälfte des Repeats modifiziert wurde. Die mutierten Plasmide wurden in den Stamm *H. volcanii* H555 transformiert und die β -Galaktosidase Aktivität nach dem Wachstum auf 0,2 % Casamminosäuren bestimmt (Abbildung 23). Im Vergleich zum Wildtyp (*H. volcanii* H555: 479 \pm 97 mU/mg) wies die Mutation 2 eine β -Galaktosidase-Aktivität von 3391 \pm 381 mU/mg auf, was einer siebenfach erhöhten Aktivität entspricht. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem „inverted repeat“ um eine Repressorbindestelle handelt, an die XacR in Abwesenheit von D-Xylose und L-Arabinose bindet, um die eigene Transkription zu reprimieren. Im Gegensatz zu Mutation 2 führte die Mutation 1, die sich stromaufwärts des Transkriptionsstarts befindet, zu einem kompletten Verlust der Aktivität anstelle einer Aktivierung. Dies könnte durch die Mutation eines potentiellen „proximal promoter elements“ (PPE) oder eines „initiator elements“ (Inr) erklärt werden, die essentiell für die Transkription sind (Brenneis et al. 2007; Grohmann and Werner 2011; Ao et al. 2013).

	TATA-Box	ww Motiv	+1	β-Galaktosidase Aktivität (mU/mg)
Wildtyp	ACAC TTATTCA	GATACTTT	GATAACG AA T AATC <u>A</u> TG	479 ± 97
Mutation 2	-----CGGC-GC-----			3391 ± 381
Mutation 1	-----GC-CCGA---			0,001

Abbildung 23 Sequenz des putativen *xacR* Repressormotives des Wildtyps und der Mutanten, sowie die gemessene β-Galaktosidase Aktivität. Dargestellt ist ein Ausschnitt der stromaufwärts von *xacR* gelegenen Sequenz, die TATA-Box und das ww Motiv sind kursiv dargestellt, +1 markiert den Transkriptionsstart (AG Schönheit). Die palindromische Sequenz des putativen Repressormotives ist durch die Pfeile links und rechts des ww Motivs sowie fette Buchstaben markiert. Die identischen Basen der Mutanten sind durch Striche (-) dargestellt und die mutierten Basen als Buchstaben. Die β-Galaktosidase Aktivität dieser Konstrukte, die bis zur stationären Phase auf 0,2 % Casaminosäuren gewachsen waren, ist auf der rechten Seite angegeben.

Die beschriebenen Versuche zur transkriptionellen Regulation des Pentoseabbaus in *H. volcanii* haben ergeben, dass XacR ein transkriptionellen Regulator ist, der die Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in Gegenwart der Pentosen aktiviert. Ein Bereich, der eine mögliche Bindestelle für XacR darstellt, konnte im Promotor von HVO_B0038A nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass XacR ein transkriptioneller Repressor seiner eigenen Synthese ist. Eine potentielle Repressorbindestelle wurde identifiziert.

5.2 D-Xylose- und D-Riboseabbau in *Haloarcula marismortui*

Bisherige Untersuchungen in *H. marismortui* haben ergeben, dass die Pentosen D-Xylose und D-Ribose als Wachstumssubstrate verwendet werden (AG Schönheit). Aus D-Xylose und D-Ribose gewachsenen Zellen wurde eine bifunktionelle Dehydrogenase gereinigt und identifiziert, die D-Xylose mit gleicher katalytischer Effizienz umsetzt wie D-Ribose (Johnsen and Schönheit 2004; AG Schönheit). Es wurde postuliert, dass auch in *H. marismortui* die Pentosen oxidativ zu α -Ketoglutarat abgebaut werden. Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Enzyme des oxidativen Pentoseabbaus liegen noch nicht vor.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die NADP^+ abhängige Bildung von α -Ketoglutarat aus D-Xylonat und D-Ribonat und Enzymaktivitäten des oxidativen Pentoseabbaus in Zellextrakten von *H. marismortui* nachgewiesen werden. Außerdem sollten ausgewählte Enzymaktivitäten des oxidativen Pentoseabbaus aus *H. marismortui* gereinigt und deren kodierende Gene identifiziert werden.

5.2.1 Enzymaktivitäten in Zellextrakten

Zellextrakte aus D-Xylose und D-Ribose gewachsenen *H. marismortui* Zellen katalysierten die NADP^+ abhängige α -Ketoglutarat Bildung aus D-Xylonat und D-Ribonat mit geringen Raten (0,5 – 1,3 mU/mg). In D-Glucose gewachsenen Zellen konnte keine α -Ketoglutarat Bildung aus D-Xylonat und D-Ribonat nachgewiesen werden (Tabelle 9), dies spricht dafür, dass in *H. marismortui* der Abbau von D-Xylose und D-Ribose durch die entsprechenden Pentosen induziert werden kann. In Zellextrakten von D-Xylose und D-Ribose gewachsenen Zellen wurden die Enzymaktivitäten einer D-Xylonat-Dehydratase (etwa 0,1 mU/mg) und einer D-Ribonat-Dehydratase (etwa 1 mU/mg) nachgewiesen (Tabelle 9). Außerdem konnte in den Zellextrakten von Pentose gewachsenen Zellen eine α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase Aktivität von etwa 100 mU/mg gemessen werden, die im Vergleich zum Wachstum auf D-Glucose fünffach induziert war (AG Schönheit, Tabelle 9).

Tabelle 9 α -Ketoglutarat Bildung aus D-Xylonat und D-Ribonat sowie die Enzymaktivitäten der D-Xylonat-Dehydratase, der D-Ribonat-Dehydratase und der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase in Zellextrakten von *H. marismortui*. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten (mU/mg) beim Wachstum auf D-Xylose, D-Ribose und D-Glucose. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte bei 37 °C. * Messung AG Schönheit.

Enzymaktivitäten (mU/mg)	Wachstum auf		
	D-Xylose	D-Ribose	D-Glucose
α -Ketoglutarat Bildung aus D-Xylonat	0,5	1,3	nicht nachweisbar
α -Ketoglutarat Bildung aus D-Ribonat	0,9	1,3	nicht nachweisbar
D-Xylonat-Dehydratase	0,2	0,1	nicht nachweisbar
D-Ribonat-Dehydratase	1,2	0,6	nicht nachweisbar
α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase*	101	93	18

5.2.2 Identifizierung und Charakterisierung der D-Xylonat- und D-Ribonat-Dehydratase

Die Zellextrakte von D-Xylose gewachsenen *H. marismortui* Zellen enthielten eine D-Xylonat-Dehydratase Aktivität von etwa 0,2 mU/mg und eine D-Ribonat-Dehydratase Aktivität von 0,4 mU/mg. Die Dehydratasen, D-Xylonat-Dehydratase und D-Ribonat-Dehydratase, wurden aus diesen Zellen mit Hilfe einer Phenyl Sepharose Säule und einer Gelfiltrationssäule partiell gereinigt. Die beiden Dehydratase Aktivitäten konnten nach der Gelfiltrationssäule, mit Hilfe der Aktivitätsprofile und der SDS-PAGE, zwei unterschiedlichen Proteinbanden zugeordnet werden. Die Fraktionen mit den jeweils höchsten Enzymaktivitäten der beiden Dehydratasen unterschieden sich um 2 ml, allerdings waren auf den Reinigungsgelen jeweils beide Dehydratasen in Form von zwei distinkten Banden bei 54 kDa und 50 kDa zu erkennen. Auf Grund des Aktivitätsprofils der D-Ribonat-Dehydratase konnte eine prominente Bande bei 50 kDa identifiziert werden, während das Aktivitätsprofil der D-Xylonat-Dehydratase einer prominenten Bande bei 54 kDa entsprach (Abbildung 24). Es wurden beide Banden eines Gelfiltrationslaufs mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert und die kodierenden Gene identifiziert (Prof. Michael Bott, Forschungszentrum Jülich).

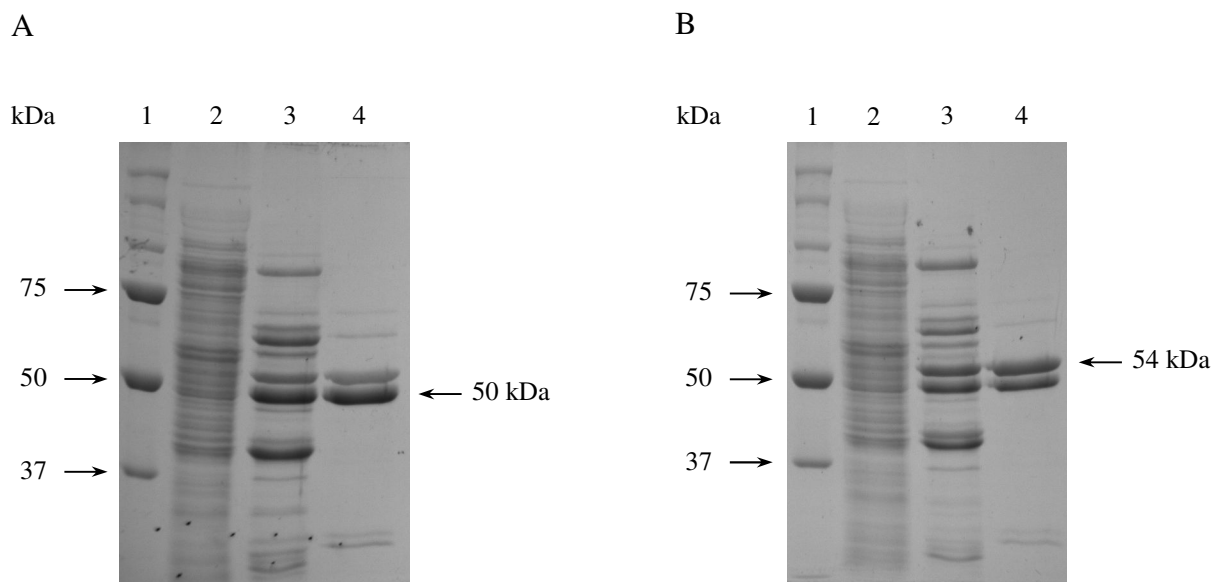


Abbildung 24 Reinigung der D-Ribonat-Dehydratase (A) und D-Xylonat-Dehydratase (B) aus *H. marismortui*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau zur Analyse der Reinigungsschritte. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, die Pfeile rechts auf die gereinigte Bande der RAD (A) beziehungsweise XAD (B). Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: zellfreier Rohextrakt (15 µg), Spur 3: nach Phenyl Sepharose (10 - 12 µg), Spur 4: nach Superdex 200 (5 µg).

Durch die MALDI-TOF Analyse wurde das kodierende Gen der D-Ribonat-Dehydratase als *rrnAC3032* identifiziert und das der D-Xylonat-Dehydratase als *rrnAC0575*. Beide Gene kodieren für Proteine der Enolase Superfamilie (COG4948). Während der partiellen Proteinreinigung wurde die D-Ribonat-Dehydratase 230-fach auf eine spezifische Aktivität von 92 mU/mg angereichert, die D-Xylonat-Dehydratase wurde 250-fach auf eine spezifische Aktivität von 60 mU/mg angereichert (Tabelle 10).

Tabelle 10 Reinigung der D-Ribonat-Dehydratase und D-Xylonat-Dehydratase aus *H. marismortui*.

Messung der spezifischen Aktivitäten bei 37 °C mit 0,1 M Tris, pH 8,5 (bei 37 °C), 1 M KCl, 20 mM MgCl₂.

Reinigungsschritt	D-Ribonat-Dehydratase		D-Xylonat-Dehydratase	
	spez. Aktivität (mU/mg)	Anreicherung (-fach)	spez. Aktivität (mU/mg)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	0,4	1	0,2	1
Phenyl Sepharose	14	35	11	45
Superdex 200	92	230	60	250

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Umsetzung von D-Xylonat und D-Ribonat von distinkten Dehydratasen katalysiert wird. Die D-Xylonat-Dehydratase wird von *rrnAC0575* und die D-Ribonat-Dehydratase von *rrnAC3032* kodiert. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Dehydratasen wurden die identifizierten Gene jeweils in den Vektor pTA963 kloniert, anschließend wurden die Proteine in *H. volcanii* H1209 überexprimiert. Die überexprimierten Dehydratasen wurden mit Hilfe einer Ni-NTA- und einer Gelfiltrationssäule gereinigt und anschließend charakterisiert.

Charakterisierung der rekombinanten D-Ribonat-Dehydratase. Das apparente Molekulargewicht des Enzyms wurde mittels Gelfiltration mit 320 ± 30 kDa bestimmt. Das apparente Molekulargewicht der Untereinheit betrug 52 kDa (Abbildung 25). Unter der Berücksichtigung des kalkulierten Molekulargewichts (44,2 kDa) sprechen diese Ergebnisse für eine homooctamere Struktur (α_8) des Enzyms. Das kalkulierte Molekulargewicht der rekombinanten D-Ribonat-Dehydratase wurde mit Angaben aus der Datenbank Halolex und mit Hilfe von Protparam errechnet (www.halolex.mpg.de/public/; web.expasy.org/protparam/).

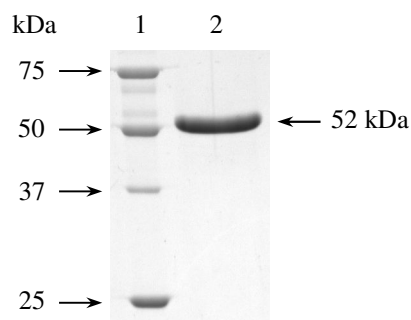


Abbildung 25 Gereinigte rekombinante D-Ribonat-Dehydratase aus *H. marismortui*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter D-Ribonat-Dehydratase, die N-terminal zusätzlich 6 Histidine aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der RAD. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: RAD nach Superdex Gelfiltration.

Das Gen *rrnAC3032* kodiert für eine Dehydratase, die spezifisch D-Ribonat umsetzt, dabei wurden 10 mM D-Ribonat mit einer spezifischen Aktivität von 0,23 U/mg umgesetzt. Andere Zuckersäuren, wie D-Xylonat, D-Gluconat, D-Galactonat oder L-Arabinat wurden nicht umgesetzt.

Charakterisierung der rekombinanten D-Xylonat-Dehydratase. Das apparente Molekulargewicht des Enzyms wurde mittels Gelfiltration mit 328 ± 30 kDa bestimmt, das der Untereinheit betrug 55 kDa (Abbildung 26). Unter der Berücksichtigung des kalkulierten Molekulargewichts (47 kDa) sprechen diese Ergebnisse für eine homooctamere Struktur (α_8) der D-Xylonat-Dehydratase. Das kalkulierte Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms wurde mit Angaben aus der Datenbank Halolex und mit Hilfe von Protparam errechnet (www.halolex.mpg.de/public/; web.expasy.org/protparam/).

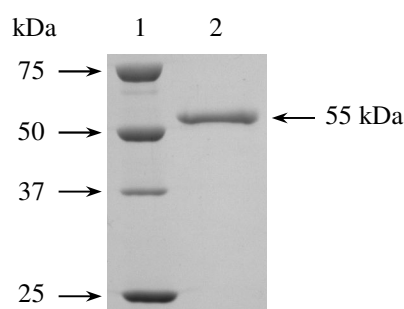


Abbildung 26 Gereinigte rekombinante D-Xylonat-Dehydratase aus *H. marismortui*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter D-Xylonat-Dehydratase, die N-terminal zusätzlich 6 Histidine aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der XAD. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: XAD nach Superdex Gelfiltration.

Die D-Xylonat-Dehydratase katalysierte die Dehydratisierung von 10 mM D-Xylonat zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat mit einer spezifischen Aktivität von etwa 0,03 U/mg. Andere Zuckersäuren wie D-Ribonat, D-Galactonat oder L-Arabinoat wurde nicht umgesetzt, dagegen wurde D-Gluconat mit einer 100-fach höheren spezifischen Aktivität umgesetzt, als D-Xylonat. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem Enzym um eine funktionelle D-Gluconat-Dehydratase handelt, die mit geringer Aktivität auch D-Xylonat umsetzt. Um dies zu prüfen, wurde die D-Gluconat-Dehydratase aus D-Glucose gewachsenen *H. marismortui* Zellen gereinigt und das kodierende Gen identifiziert. Die D-Gluconat-Dehydratase katalysiert in dem semiphosphorylierten ED-Weg die Umsetzung von D-Gluconat zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Gluconat (Johnsen et al. 2001).

Reinigung und Identifizierung der D-Gluconat-Dehydratase. Die Zellextrakte von D-Glucose gewachsenen *H. marismortui* Zellen enthielten eine D-Gluconat-Dehydratase Aktivität von 0,09 U/mg. Das Enzym wurde mit einer Phenyl Sepharose Säule und einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Danach wies das 236-fach angereicherte Enzym eine spezifische Aktivität von 21,25 U/mg auf (Tabelle 11).

Tabelle 11 Reinigung der D-Gluconat-Dehydratase aus *H. marismortui*. Messung der spezifischen Aktivität bei 37 °C mit 0,1 M Tris, pH 8,5 (bei 37 °C), 1 M KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM D-Gluconat und 2,8 µg – 163 µg Protein. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	325	31,7	0,09	100	1
Phenyl Sepharose	3,10	10,15	3,27	32	36
Superdex 200	0,11	2,38	21,25	7,5	236

Mittels SDS-PAGE konnte eine distinkte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 54 kDa identifiziert werden (Abbildung 27). Die D-Gluconat-Dehydratase wurde mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert, dabei konnte das Gen *rrnAC0575* identifiziert werden. Damit bestätigt sich die Vermutung, dass die D-Xylonat-Dehydratase und die D-Gluconat-Dehydratase in *H. marismortui* ein identisches Enzym darstellen, das von *rrnAC0575* kodiert wird.

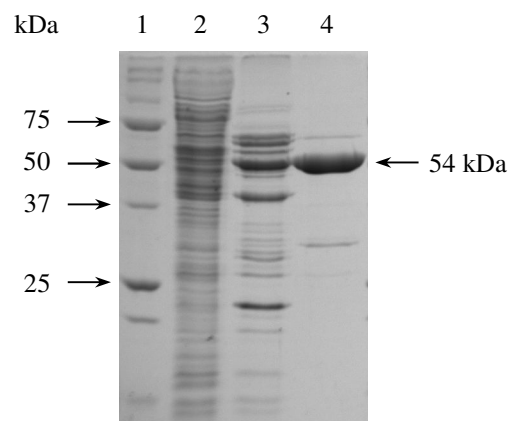


Abbildung 27 Reinigung der D-Gluconat-Dehydratase aus *H. marismortui*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau zur Analyse der Reinigungsschritte. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der GAD. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: zellfreier Rohextrakt (15 µg), Spur 3: nach Phenyl Sepharose (10 µg), Spur 4: nach Superdex 200 (5 µg).

5.2.3 Identifizierung und Charakterisierung der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase

Die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase katalysiert den letzten Schritt des oxidativen Pentoseabbaus, dabei wird α -Ketoglutarat-Semialdehyd zu α -Ketoglutarat umgesetzt. Als artifizielles Substrat setzt das Enzym auch Glutardialdehyd um, was zur partiellen Reinigung des Enzyms diente, da das natürliche Substrat α -Ketoglutarat-Semialdehyd nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stand (Watanabe et al. 2006a). Extrakte aus D-Xylose gewachsenen *H. marismortui* Zellen katalysierten eine NADP⁺ abhängige Umsetzung von Glutardialdehyd mit einer spezifischen Aktivität von etwa 0,056 U/mg. Aus diesen Zellen wurde die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase durch eine Phenyl Sepharose Säule und eine Gelfiltrationssäule partiell gereinigt. Das 40-fach angereicherte Enzym wies bei der Umsetzung von Glutardialdehyd eine spezifische Aktivität von 2,22 U/mg auf (Tabelle 12).

Tabelle 12 Reinigung der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase aus *H. marismortui*. Messung der spezifischen Aktivität bei 37 °C mit 0,1 M Tris, pH 8,5 (bei 37 °C), 1 M KCl, 1 mM NADP⁺, 5 mM Glutardialdehyd und 5,8 μ g – 75,8 μ g Protein. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	758	44,41	0,056	100	1
Phenyl Sepharose	21,38	7,9	0,37	17,8	6,6
Superdex 200	0,581	1,29	2,22	2,9	39,6

Mittels SDS-PAGE konnte eine Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 70 kDa identifiziert werden (Abbildung 28). Die KGSADH wurde mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert, dabei wurde das Gen *rrnAC3036* identifiziert. Dieses Gen kodiert für ein Protein der Aldehyd Dehydrogenase Superfamilie, das eine Länge von 481 Aminosäuren aufweist. Diese starke Überbestimmung des apparenten Molekulargewichtes der Untereinheit mittels SDS-PAGE (70 kDa) im Vergleich zum kalkulierten Molekulargewicht (51 kDa) wurde auch bei dem homologen Enzym aus *Haloferax volcanii* beobachtet (Johnsen et al. 2009).

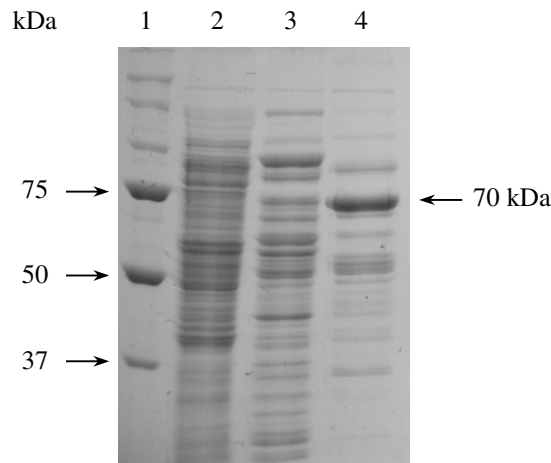


Abbildung 28 Partielle Reinigung der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase aus *H. marismortui*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau zur Analyse der Reinigungsschritte. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der KGSADH. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: zellfreier Rohextrakt (15 μ g), Spur 3: nach Phenyl Sepharose (10 μ g), Spur 4: nach Superdex 200 (5 μ g).

Charakterisierung der rekombinanten α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase.

Der ORF *rrnAC3036* wurde in den Vektor pTA963 kloniert und das Protein in *H. volcanii* H1209 überexprimiert. Anschließend wurde das überexprimierte Protein mit Hilfe einer Ni-NTA- und einer Gelfiltrationssäule gereinigt. Das apparente Molekulargewicht der rekombinanten KGSADH wurde mit 203 ± 15 kDa bestimmt. Das apparente Molekulargewicht der Untereinheit wurde mittels SDS-PAGE mit 71 kDa deutlich überbestimmt (Abbildung 29), denn das kalkulierte Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms beträgt 51,6 kDa (Halolex, Protparam). Auf der Basis des kalkulierten Molekulargewichtes sprechen die Ergebnisse für eine homotetramere Struktur (α_4) des Proteins.

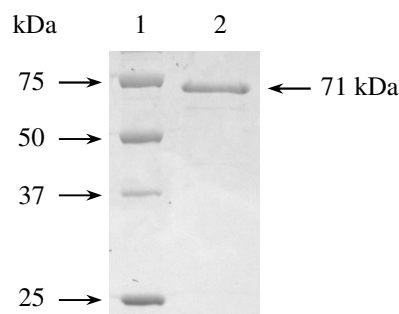


Abbildung 29 Gereinigte rekombinante α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase aus *H. marismortui*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase, die N-terminal zusätzlich 6 Histidine aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der KGSADH. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: KGSADH nach Superdex Gelfiltration.

Die rekombinante α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH) katalysierte die Oxidation von 20 mM α -Ketoglutarat-Semialdehyd mit einer spezifischen Aktivität von 0,13 U/mg (Abbildung 30A). Da α -Ketoglutarat-Semialdehyd nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung stand, wurden höhere Substratkonzentrationen nicht getestet, so dass die K_m - und V_{max} -Werte für α -Ketoglutarat-Semialdehyd nicht abgeschätzt werden konnten. Andere Aldehyde wie das artifizielle Substrat Glutardialdehyd (Abbildung 30B) und Succinat-Semialdehyd wurden mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,15 mM und 11,1 U/mg beziehungsweise 0,46 mM und 0,14 U/mg umgesetzt. Das Enzym katalysierte die Umsetzung von Glutardialdehyd sowohl mit $NADP^+$ als auch mit NAD^+ als Cofaktor. $NADP^+$ und NAD^+ wurden mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,02 mM und 12,1 U/mg beziehungsweise 0,8 mM und 58,7 U/mg umgesetzt. Dabei wurde $NADP^+$ mit einer deutlich höheren katalytischen Effizienz ($K_{cat}/K_m = 514 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) als NAD^+ ($62 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) umgesetzt, was für $NADP^+$ als natürlichen Elektronenakzeptor spricht.

Die kinetischen Parameter der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

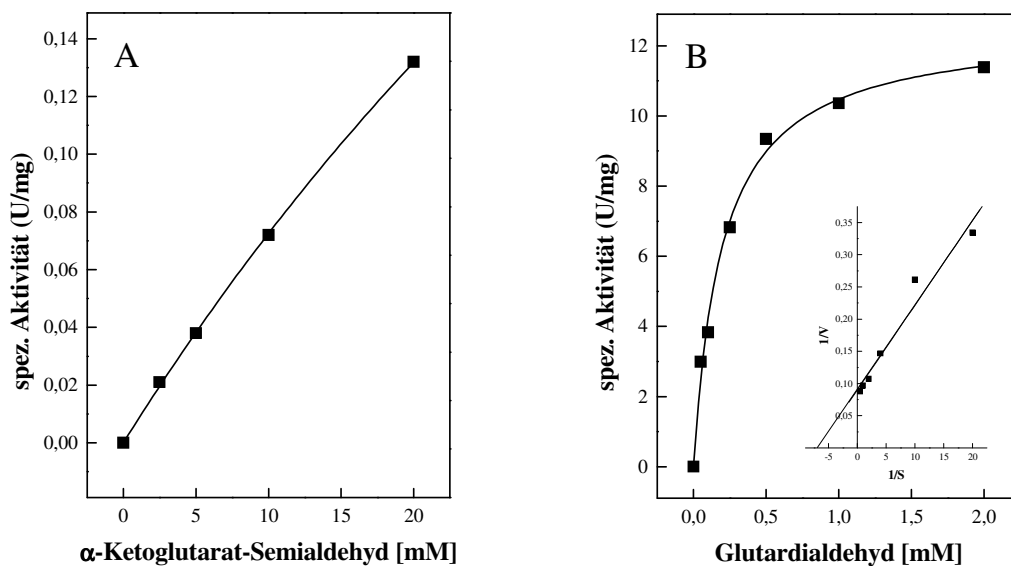


Abbildung 30 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase aus *H. marismortui* von α -Ketoglutarat-Semialdehyd (A) und Glutardialdehyd (B). Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt, die in Einschüben dargestellt sind.

Tabelle 13 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase aus *H. marismortui*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 37 °C bestimmt.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		203 ± 15
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) ¹		71
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) ²		51,6
Oligomere Struktur		α_4
Apparenter V_{\max} (U/mg)	Glutardialdehyd	11,1
	Succinat-Semialdehyd	0,14
	α -Ketoglutarat-Semialdehyd	n.b.*
Apparenter K_m (mM)	Glutardialdehyd	0,15
	Succinat-Semialdehyd	0,46
K_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	NADP ⁺	514
	NAD ⁺	62

¹ Bestimmung mittels SDS-PAGE

² Halolex (www.halolex.mpg.de/public/) und Protparam (web.expasy.org/protparam/)

* nicht bestimmt. 20 mM α -Ketoglutaratsemialdehyd wurden mit einer spezifischen Aktivität von 0,13 U/mg umgesetzt.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, dass auch in *H. marismortui* D-Xylose und D-Ribose oxidativ zu α -Ketoglutarat abgebaut werden. Dazu wurden in Zellextrakten die α -Ketoglutarat Bildung aus D-Xylonat und D-Ribonat sowie einige Enzymaktivitäten der weiteren oxidativen Umsetzung nachgewiesen. Die Enzyme D-Xylonat-Dehydratase, D-Ribonat-Dehydratase und α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase wurden nativ gereinigt und die kodierenden Gene als rrnAC0575, rrnAC3032 und rrnAC3036 identifiziert.

5.3 D-Xyloseabbau in *Halorhabdus utahensis*

Genomanalysen von *Halorhabdus utahensis* deuten darauf hin, dass die Gene des oxidativen Pentoseabbaus, wie für *H. volcanii* und *H. marismortui* gezeigt, fehlen, dafür enthält das Genom von *H. utahensis* die Gene einer D-Xylose-Isomerase (Huta_2443) und einer D-Xylulose-Kinase (Huta_2446) (Abbildung 31) (Anderson et al. 2011). Diese beiden Proteine katalysieren vermutlich, wie in den meisten Bacteria, den Abbau von D-Xylose. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Wachstum von *H. utahensis* auf D-Xylose charakterisiert werden, danach sollten die Enzymaktivitäten der D-Xylose-Isomerase und der D-Xylulose-Kinase in Zellextrakten nachgewiesen werden. Anschließend wurde die D-Xylose-Isomerase überexprimiert und charakterisiert.

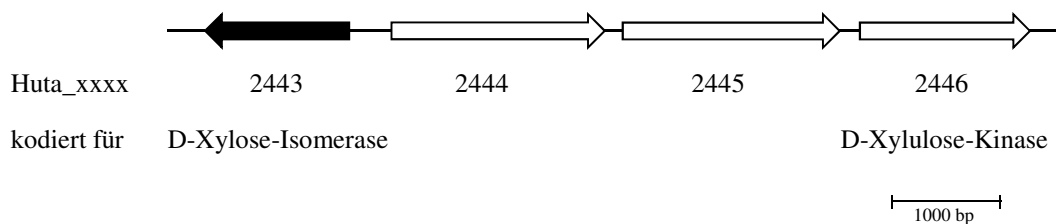


Abbildung 31 Genomumgebung der Gene des D-Xyloseabbaus in *H. utahensis*. Die Gene Huta_2443 und Huta_2446 kodieren für die D-Xylose-Isomerase beziehungsweise die D-Xylulose-Kinase. Das Gen der D-Xylose-Isomerase ist schwarz markiert. Der Maßstab weist eine Länge von 1000 bp auf.

5.3.1 Wachstum auf D-Xylose und Zellextraktmessungen

Das Wachstum auf 15 mM D-Xylose ist in Abbildung 32 dargestellt. *H. utahensis* wuchs innerhalb von 100 h auf eine maximale optische Dichte von etwa 1, wobei die D-Xylose fast vollständig verbraucht wurde.

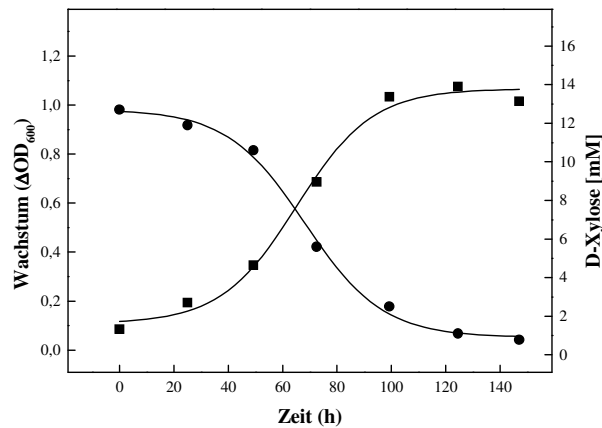


Abbildung 32 Wachstum von *H. utahensis* auf 15 mM D-Xylose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dargestellt ist das Wachstum von *H. utahensis* (■) und die Substratabnahme von D-Xylose (●). Die Vorkulturen wurden in *H. utahensis* Medium mit 15 mM D-Xylose gezogen. Die Messung des Wachstums erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

In Extrakten von D-Xylose gewachsenen *H. utahensis* Zellen konnten keine Aktivitäten von Schlüsselenzymen des oxidativen Pentoseabbaus, einer D-Xylose-Dehydrogenase und einer α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase, nachgewiesen werden. Stattdessen enthielten die Extrakte Aktivitäten einer D-Xylose-Isomerase (50 mU/mg) sowie einer D-Xylulose-Kinase (400 mU/mg). Das Vorkommen dieser Enzymaktivitäten ist in Übereinstimmung mit Genomanalysen von *H. utahensis* (Anderson et al. 2011).

5.3.2 Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten D-Xylose-Isomerase

Um zu zeigen, dass das Gen Huta_2443 für eine funktionelle D-Xylose-Isomerase kodiert, wurde das Gen in den Vektor pTA963 kloniert und in *H. volcanii* H1209 überexprimiert. Anschließend wurde das Enzym mittels Ni-NTA und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Das apparente Molekulargewicht der D-Xylose-Isomerase wurde mittels Gelfiltration mit 175 ± 15 kDa bestimmt, durch die SDS-PAGE wurde das apparente Molekulargewicht der Untereinheit von 56 kDa bestimmt (Abbildung 33). Auf der Basis des kalkulierten Molekulargewichts von 50,2 kDa (Halolex, Protparam), sprechen die Ergebnisse für eine homotetramere (α_4) oder homotrimere (α_3) Form des Enzyms.

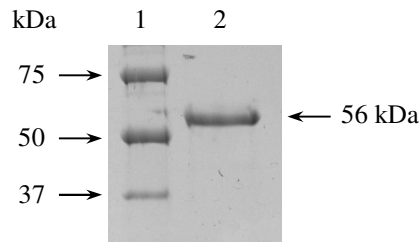


Abbildung 33 Gereinigte rekombinante D-Xylose-Isomerase aus *H. utahensis*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter D-Xylose-Isomerase, die N-terminal zusätzlich 6 Histidine aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der D-Xylose-Isomerase. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: D-Xylose-Isomerase nach Superdex Gelfiltration.

Die D-Xylose-Isomerase katalysierte die Umsetzung von D-Xylose zu D-Xylulose mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 29,7 mM und 4,21 U/mg. Neben D-Xylose wurde auch D-Glucose mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 537 mM und 1,28 U/mg umgesetzt (Abbildung 34). Die Umsetzung von D-Xylose ($K_{cat}/K_m = 0,117 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) erfolgte mit einer 50-fach höheren katalytischen Effizienz als die von D-Glucose ($0,002 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

Eine Zusammenfassung der molekularen und kinetischen Eigenschaften der D-Xylose-Isomerase ist in Tabelle 14 dargestellt.

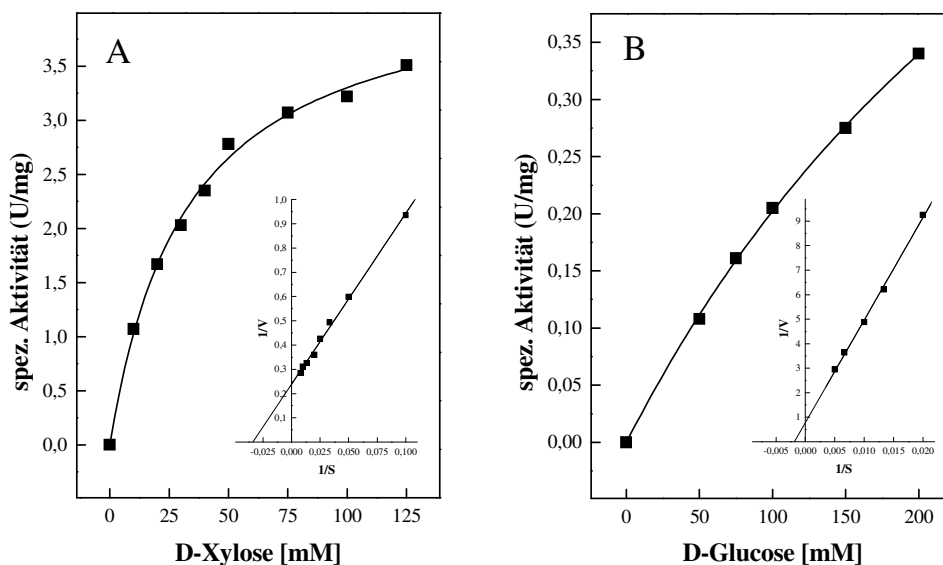


Abbildung 34 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten D-Xylose-Isomerase aus *H. utahensis* von D-Xylose (A) und D-Glucose (B). Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt, die in Einschüben dargestellt sind.

Tabelle 14 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten D-Xylose-Isomerase aus *H. utahensis*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 37 °C bestimmt.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		175 ± 15
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) ¹		56
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) ²		49,3
Oligomere Struktur		α_4 oder α_3
Apparenter V_{\max} (U/mg)	D-Xylose	4,21
	D-Glucose	1,28
Apparenter K_m (mM)	D-Xylose	29,7
	D-Glucose	537
K_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	D-Xylose	0,117
	D-Glucose	0,002

¹ Bestimmung mittels SDS-PAGE

² Halolex (www.halolex.mpg.de/public/) und Protparam (web.expasy.org/protparam/)

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *H. utahensis* D-Xylose, wie die meisten Bacteria, mit Hilfe einer D-Xylose-Isomerase und einer D-Xylulose-Kinase zu D-Xylulose-5-Phosphat abbaut und nicht oxidativ zu α -Ketoglutarat, wie es für *H. volcanii* und *H. marismortui* gezeigt wurde.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Pentoseabbau in den Haloarchaeen *Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui* und *Halorhabdus utahensis* untersucht. Dabei wurde in *H. volcanii* die funktionelle Beteiligung einer Lactonase, kodiert von HVO_B0030, am oxidativen Abbau von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose zu α -Ketoglutarat gezeigt. Außerdem wurde gezeigt, dass alle beteiligten Gene des Pentoseabbaus beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose transkriptionell induziert werden, dabei ist der Transkriptionsregulator XacR an der Aktivierung essentiell beteiligt. Neben dieser Funktion von XacR als Aktivator konnte nachgewiesen werden, dass XacR seine eigene Synthese reprimiert. Für das halophile Archaeon *H. marismortui* ist bekannt, dass der erste Schritt des Abbaus von D-Xylose und D-Ribose von einer bifunktionellen Dehydrogenase katalysiert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass an der weiteren Umsetzung von D-Xylonat und D-Ribonat zu α -Ketoglutarat eine D-Xylonat-Dehydratase, eine D-Ribonat-Dehydratase und eine α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase beteiligt sind. Die kodierenden Gene *rrnAC0575*, *rrnAC3032* und *rrnAC3036* wurden identifiziert und die rekombinanten Enzyme charakterisiert. Für das halophile Archaeon *H. utahensis* wurde gezeigt, dass D-Xylose nicht oxidativ, sondern wie in den meisten Bacteria, durch eine D-Xylose-Isomerase und eine D-Xylulose-Kinase zu D-Xylulose-5-Phosphat abgebaut wird. Die Xylose-Isomerase wurde überexprimiert und charakterisiert.

6.1 D-Xylose- und L-Arabinoseabbau in *Haloferax volcanii*

6.1.1 Beteiligung einer Lactonase am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose

Der erste Schritt des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus wird in *H. volcanii* von zwei distinkten Dehydrogenasen katalysiert, der D-Xylose-Dehydrogenase und der L-Arabinose-Dehydrogenase (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese Dehydrogenasen die Umsetzung der Pentosen zu D-Xylonolacton beziehungsweise L-Arabinolacton katalysieren und nicht zu den entsprechenden Säuren. Dies deutet auf die notwendige Beteiligung einer Lactonase hin, die die Umwandlung von D-Xylonolacton beziehungsweise L-Arabinolacton zu D-Xylonat beziehungsweise L-Arabinat katalysiert. Die Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus bilden ein Gencluster auf dem Plasmid pHV3. Innerhalb dieses Genclusters liegt das Gen HVO_B0030, das für eine hypothetische Lactonase der SGL-Proteinfamilie (Pfam: PF08450) kodiert.

Es konnte gezeigt werden, dass diese hypothetische Lactonase beim Wachstum auf D-Xylose und L-Arabinose transkriptionell induziert wird. Dies war ein erster Hinweis für die Beteiligung der Lactonase am Abbau der Pentosen. Das Gen HVO_B0030 wurde homolog überexprimiert und das gereinigte Protein als ein 30 kDa Monomer biochemisch charakterisiert. Die rekombinante Lactonase katalysierte sowohl die Umsetzung von D-Xylonolacton und L-Arabinolacton als auch von D-Gluconolacton und D-Galactonolacton zu den entsprechenden Säuren. Dabei war die Aktivität der Lactonase abhängig von divalenten Kationen, wie es auch für andere Lactonasen der SGL-Proteinfamilie gezeigt wurde (Chen et al. 2008; Aizawa et al. 2013). Um den Einfluss der Lactonase auf das Wachstum von *H. volcanii* auf D-Xylose und L-Arabinose zu prüfen, wurde die Lactonase mit Hilfe der sogenannten pop-in/pop-out Methode deletiert und das Wachstum analysiert. Dabei zeigte sich beim Wachstum der Deletionsmutante auf L-Arabinose ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, durch eine *in trans* Komplementation mit HVO_B0030 konnte der Phänotyp des Wildtyps wiederhergestellt werden. Das Wachstum auf D-Xylose wurde jedoch nicht signifikant beeinflusst. Der geringe Einfluss der Deletion der Lactonase auf das Wachstum lässt sich dadurch erklären, dass einige Lactone auch spontan zu den entsprechenden Säuren hydrolysieren (Jermyn 1960). Insbesondere Temperatur und pH-Wert beeinflussen die spontane Hydrolyserate, deshalb wurde für das hyperthermophile Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* diskutiert, dass bei den hohen Wachstumstemperaturen von 80 °C die Lactone auch ohne eine Lactonase schnell genug für ein ungehindertes Wachstum hydrolysieren (Brouns et al. 2006). Außerdem wurde bisher nicht untersucht, ob das Genom von *H. volcanii* für weitere Lactonasen kodiert, die auch Pentonolactone hydrolysieren und damit die deletierte Lactonase ersetzen können. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der transkriptionellen Induktion der Lactonase beim Wachstum auf den Pentosen, die Charakterisierung der rekombinanten Lactonase sowie der leichte Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante, dass die Lactonase (HVO_B0030) am Abbau von D-Xylose und L-Arabinose in *H. volcanii* beteiligt ist. Dies ist die erste Beschreibung einer Lactonase des Pentoseabbaus in der Domäne der Archaea.

Es gibt nur wenige Informationen zu Lactonasen, die am Abbau von Pentosen beteiligt sind, zum Beispiel wurde die bakterielle L-Arabinolactonase aus *Azospirillum brasiliense* charakterisiert (Watanabe et al. 2006b) und eine D-Xylonolactonase Aktivität in Zellextrakten von *Gluconobacter oxydans* nachgewiesen (Buchert and Viikari 1988). Dagegen wurden deutlich mehr Gluconolactonasen (GNL) charakterisiert (Chen et al. 2008; Zachariou and Scopes 1986; Kondo et al. 2006; Hucho and Wallenfels 1972; Jermyn 1960). Die GNL aus

Xanthomonas campestris beziehungsweise *Zymomonas mobilis* wurden als etwa 64 kDa homodimere Proteine beschrieben (Chen et al. 2008; Zachariou and Scopes 1986). Das SMP-30 aus *Mus musculus* wurde dagegen, wie die Lactonase aus *H. volcanii*, als monomeres Protein von etwa 32 kDa beschrieben (Tabelle 15) (Kondo et al. 2006). Die GNLs können entweder hoch spezifisch D-Gluconolacton hydrolysieren, wie die GNLs aus *X. campestris* und *Pseudomonas fluorescens* (Chen et al. 2008; Jermyn 1960), oder zeigen ein relativ breites Substratspektrum. So setzt die GNL aus *E. coli* neben D-Gluconolacton auch D-Galactonolacton um, das SMP-30 Protein aus *M. musculus* katalysiert die Umsetzung von D- und L-Gluconolacton, D-/L-Gulonolacton und D- beziehungsweise L-Galactonolacton. Die am Abbau von Pentosen beteiligten Lactonasen zeigen ebenfalls ein breites Substratspektrum. So setzt die D-Xylonolactonase aus *G. oxydans* neben D-Xylonolacton auch das D-Galactonolacton um und die L-Arabinolactonase aus *A. brasiliense* katalysiert die Hydrolyse des L-Arabinolactons und des D-Galactonolactons. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte Lactonase aus *H. volcanii* setzte neben D-Xylonolacton und L-Arabinolacton auch D-Galactonolacton und D-Gluconolacton um (Tabelle 15).

Tabelle 15 Molekulare und katalytische Eigenschaften der D-Xylono-/L-Arabinolactonase aus *Haloferax volcanii*, der L-Arabinolactonase aus *Azospirillum brasiliense* (Watanabe et al. 2006b), und Gluconolactonasen aus *Escherichia coli* (Hucho and Wallenfels 1972), *Xanthomonas campestris* (Chen et al. 2008), *Zymomonas mobilis* (Zachariou and Scopes 1986) und des SMP-30 aus *Mus musculus* (Kondo et al. 2006). - = keine Angabe.

	<i>H. volcanii</i>	<i>A. brasiliense</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. musculus</i>	<i>X. campestris</i>	<i>Z. mobilis</i>
Enzym	XANL	ANL	GNL	SMP-30	GNL	GNL
Molekulare Masse (kDa)						
Natives Enzym	28	-	30	-	-	63
Untereinheit	32,3	35	-	34	33,2	32
Oligomere Struktur	α_1	-	-	α_1	α_2	α_2
relative Aktivität (%)						
D-Xylonolacton	56	-	-	-	-	-
L-Arabinolacton	100	100	-	-	-	-
D-Gluconolacton	200	-	100	100	100	100
L-Gluconolacton	-	-	-	2,5	-	-
D-Galactonolacton	100	100	15	4,3	-	-
L-Galactonolacton	-	-	-	0,4	-	-
D-Gulonolacton	-	-	-	5,5	-	-
L-Gulonolacton	-	-	-	1,2	-	-

Proteine der SGL-Familie weisen eine SMP-30/Gluconolactonase/LRE-like Region auf und zeigen alle eine Faltung in Form eines „Beta Propellers“. Die Aminosäuresequenzähnlichkeit innerhalb der Proteinfamilie ist allerdings eher niedrig (Paoli 2001). Das namensgebende „senescence marker protein-30“ (SMP-30) aus *Mus musculus* zeigte eine veränderte Proteinexpression im Verlauf der Alterung der Tiere und ist essentiell für die Vitamin C Biosynthese, des Weiteren konnte eine Gluconolactonaseaktivität des Enzyms nachgewiesen werden. Zu dieser Proteinfamilie gehören neben SMP-30 auch bakterielle Lactonasen, wie die identifizierte L-Arabinolactonase aus *Azospirillum brasiliense*, die putative D-Xylonolactonase aus *Caulobacter crescentus*, sowie die Gluconolactonase (GNL) aus *Xanthomonas campestris*. Mittlerweile wurden die Kristallstrukturen der GNL aus *X. campestris* sowie des SMP-30 aus *M. musculus* aufgeklärt (Chen et al. 2008; Aizawa et al. 2013). In beiden Strukturen konnten vier konservierte Aminosäurereste identifiziert werden, die ein divalentes Kation und/oder das Substrat- beziehungsweise Produktmolekül in der Substratbindetasche komplexieren. Ein Alignment der Aminosäuresequenz zeigt, dass diese vier Aminosäurereste auch in der Lactonase aus *H. volcanii*, der L-Arabinolactonase aus *A. brasiliense* und der putativen D-Xylonolactonase aus *C. crescentus* konserviert sind (Abbildung 35). Die Lactonase aus *H. volcanii* zeigte dabei zu den anderen Lactonasen 24 bis 28 % identische Aminosäuren. Auf Grund der Kristallstruktur des SMP-30 lässt sich für SMP-30 eine Sekundärstruktur vorhersagen, die unter der Aminosäuresequenz des Alignments dargestellt ist. Die vorhergesagte Sekundärstruktur (PSIPRED) der Lactonase aus *H. volcanii* ist über der Aminosäuresequenz des Alignments abgebildet und zeigt eine große Ähnlichkeit zur Sekundärstruktur des SMP-30. Dies deutet darauf hin, dass die Lactonase aus *H. volcanii* eine ähnliche Faltung besitzt wie das SMP-30 aus *M. musculus*.

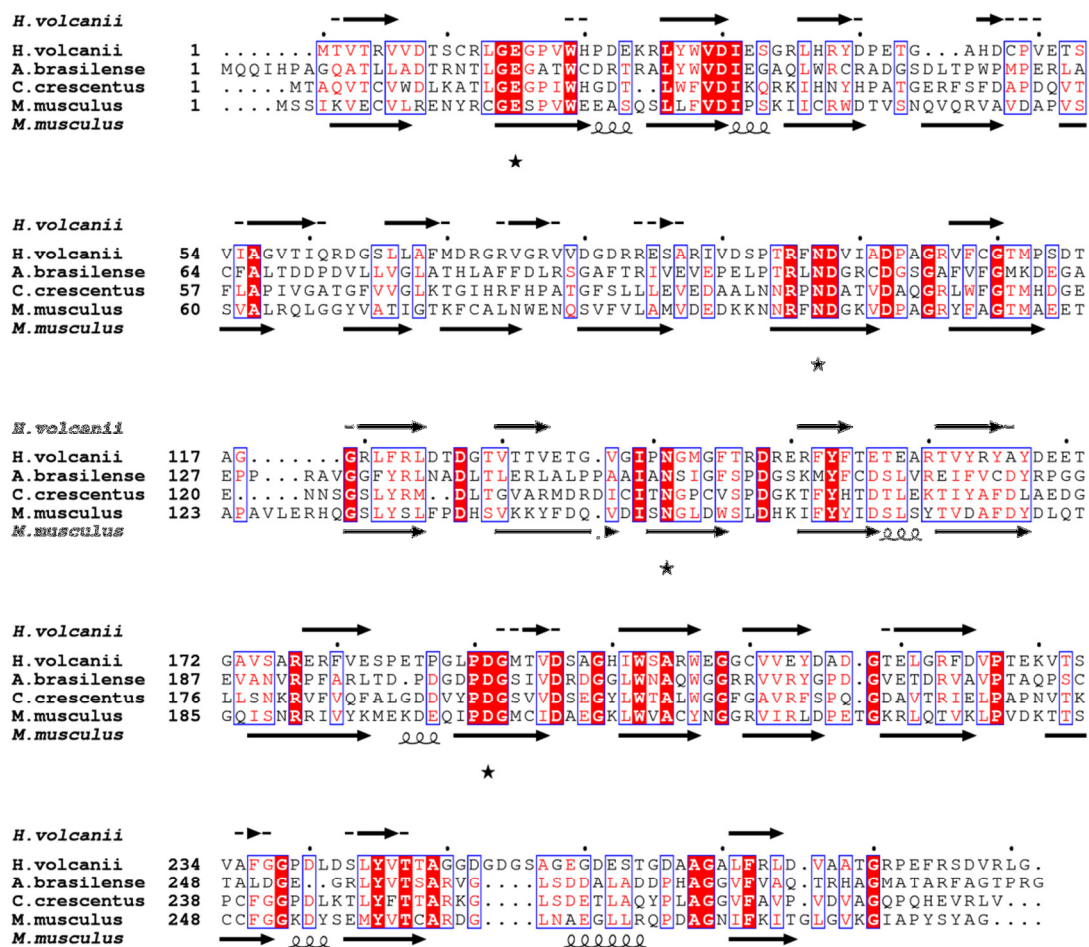


Abbildung 35 Multiples Aminosäuresequenzalignment der Lactonase (HVO_B0030) aus *H. volcanii*, zwei bakteriellen homologen Lactonasen aus *A. brasiliense* und *C. crescentus* und dem SMP-30 aus *M. musculus*. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt, die Darstellung des Alignments und der Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe von ESPrnt-<http://esprnt.ibcp.fr> (Larkin et al. 2007; Gouet et al. 2003). Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt. Die vorhergesagte Sekundärstruktur der XANL aus *H. volcanii* ist über der Sequenz dargestellt (PSIPRED), die Sekundärstruktur des SMP-30 aus *M. musculus* ist unter der Sequenz abgebildet, PDB ID:4GN7 (Aizawa et al. 2013). Die Aminosäurereste Glutamat18, Asparagin103, Asparagin 154 sowie Aspartat204 komplexieren in SMP-30 das divalente Kation und/oder das Substrat-beziehungsweise Produktmolekül und sind durch einen schwarzen Stern unterhalb der Sequenz markiert. *Haloferax volcanii*, HVO_B0030 (YP_003533110.1); *Azospirillum brasiliense*, ANL (BAE94275.1); *Caulobacter crescentus*, XNL (AAK22805.1); *Mus musculus*, SMP30 (NP_033086.1).

6.1.2 Transkriptionelle Regulation der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass alle beteiligten Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus transkriptionell beim Wachstum auf den beiden Pentosen induziert werden. Dieser Befund deutet auf eine gemeinsame transkriptionelle Regulation beider Wege hin. Direkt stromabwärts des Genclusters der Gene des Pentoseabbaus liegt das Gen HVO_B0040, das für einen Transkriptionsregulator kodiert. Zunächst wird eine bioinformatische Analyse des Transkriptionsregulators vorgestellt. Anschließend wird gezeigt, dass dieser Regulator die Transkription der Gene des Pentoseabbaus aktiviert und als Repressor seiner eigenen Synthese fungiert. Deshalb wurde der Transkriptionsregulator XacR (D-xylose and L-arabinose catabolism regulator) genannt.

BlastP-Analysen mit XacR aus *H. volcanii* zeigten homologe Proteine in Bacteria und halophilen Archaea, die alle als Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie annotiert waren, während keine Homologen in anderen Archaea oder in Eukarya gefunden werden konnten. Mitglieder der IclR-Proteinfamilie zeigen eine konservierte Proteinfaltung, dabei weisen sie ein für bakterielle Transkriptionsregulatoren typisches „winged helix turn helix“ (wHTH) DNA-Bindemotiv am N-Terminus und eine C-terminale IclR spezifische Effektorbindedomäne auf (Molina-Henares et al. 2006; Zhou et al. 2012). Die Kristallstrukturen des IclR aus *T. maritima* und der C-terminalen Domäne des IclR aus *E. coli* wurden bereits aufgeklärt (Zhang et al. 2002; Lorca et al. 2007). Ein multiples Aminosäure Sequenzalignment mit XacR aus *H. volcanii*, einem homologen Protein aus *Haloarcula marismortui* (rrnAC1338), zwei putativen IclR-like Proteinen aus Bacteria sowie mit IclR aus *E. coli* und einem IclR-like Protein aus *T. maritima* ergab, dass konservierte Sequenzbereiche auch in den haloarchaellen Proteinen vorhanden sind (Abbildung 36). Prosite-Analysen mit XacR ergaben ein HTH DNA-Bindemotiv (Aminosäuren 28 bis 47) bestehend aus zwei α -Helices ($\alpha 2$ und $\alpha 3$, blau markiert) innerhalb des IclR typischen HTH Motivs (Aminosäuren 7 bis 66; PS51077). Weiterhin konnte eine IclR Effektor Bindedomäne (Aminosäuren 81 bis 251; PS51078) sowie ein konserviertes Cystein zur Zn^{2+} Bindung (durch einen Stern markiert) identifiziert werden (Zhang et al. 2002; AG Schönheit). Die bioinformatischen Analysen zeigen, dass XacR (HVO_B0040) für einen Transkriptionsregulator der IclR-Proteinfamilie kodiert. In Bacteria fungieren IclR-like Regulatoren als Repressoren und/oder Aktivatoren der Transkription von Genen (Molina-Henares et al. 2006; Zhou et al. 2012).

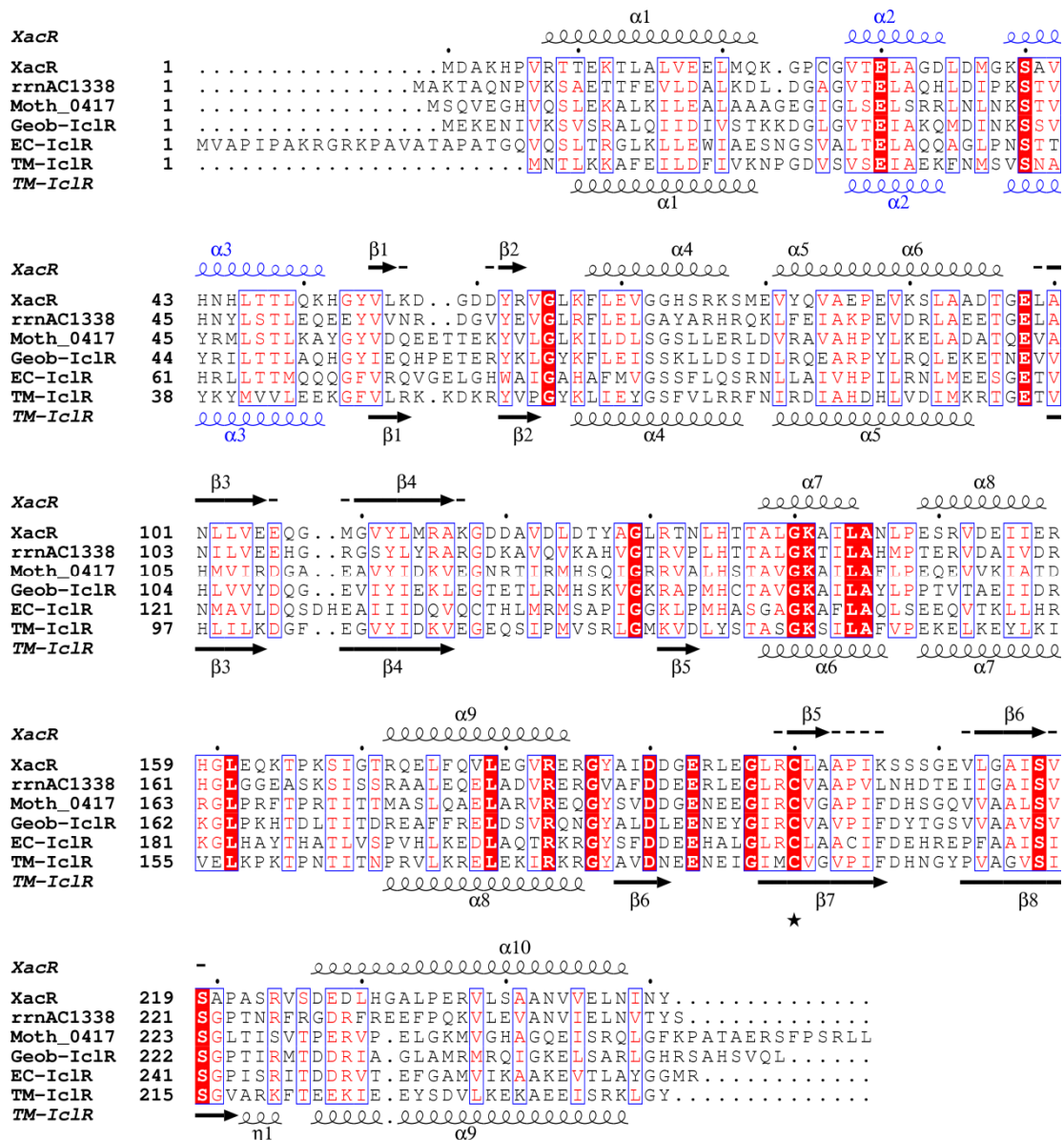


Abbildung 36 Multiples Aminosäuresequenzalignment von XacR (HVO_B0040) aus *H. volcanii*, einem homologen Protein aus *H. marismortui* (rrnAC1338) und ausgewählten IclR Sequenzen aus Bacteria (AG Schönheit). Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt, die Darstellung des Alignments und der Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe von ESPript-<http://esprict.ibcp.fr> (Larkin et al. 2007; Gouet et al. 2003). Identische Aminosäuren sind hinterlegt. Die zwei α -Helices des HTH DNA-Bindemotivs sind blau markiert. Das konservierte Cystein zur Zn^{2+} Bindung ist durch einen Stern markiert. Die vorhergesagte Sekundärstruktur von XacR aus *H. volcanii* ist über der Aminosäuresequenz dargestellt (PSIPRED), die Sekundärstruktur des IclR aus *T. maritima* ist unter der Sequenz abgebildet, PDB ID:1MKM (Zhang et al. 2002). XacR, *Haloferax volcanii*, HVO_B0040; *Haloarcula marismortui*, rrnAC1338; *Moorella thermoacetica*, Moth_0417; Geob-IclR, *Geobacillus thermodenitrificans*, YP_001125502, EC-IclR, *Escherichia coli*, P16528; TM-IclR, *Thermotoga maritima*, TM0065.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch XacR aus *H. volcanii* ein transkriptioneller Aktivator der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus ist. Transkriptanalysen ergaben, dass die Transkripte der Gene des Pentoseabbaus in einer XacR Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp nicht nachweisbar waren. Durch eine *in trans* Komplementation mit XacR konnten die Transkripte in Gegenwart von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose wieder nachgewiesen werden. Transkriptionsaktivatoren binden in der Regel an archaeellen Promotoren stromaufwärts der TATA-Box an „upstream activator sequences“ (UAS). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein UAS enthaltender Bereich im Promotor der D-Xylonat-Dehydratase (XAD), kodiert von HVO_B0038A, identifiziert. Dieser Bereich wurde zwischen 31 und 42 bp stromaufwärts des TSS identifiziert. Auf Basis dieser Informationen und mit Hilfe der Plasmide der *bgaH*-Reporterfusion, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden, konnte nun im Rahmen einer Masterarbeit (Anne-Christine Schulz, 2014) mittels „scanning“-Mutagenese das Motiv GACC, das sich stromaufwärts der TATA-Box und des BRE befindet, als essentielle Nukleotide für die transkriptionelle Aktivierung von XAD identifiziert werden. In der Zwischenzeit wurden mit weiteren Promotoren der D-Xylose und L-Arabinose aktivierten Gene, die für die L-Arabinose-Dehydrogenase, die 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase und die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase kodieren, „scanning“-Mutagenese Experimente durchgeführt (AG Schönheit). Gemeinsam mit den Experimenten aus der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Bindemotiv in Form eines „inverted repeats“ identifiziert werden, wie es zum Beispiel für die „arabox“ aus *Sulfolobus solfataricus* gezeigt werden konnte. Die „arabox“ ist eine konservierte UAS in den Promotoren der Gene des oxidativen D-Arabinoseabbaus, die beim Wachstum auf D-Arabinose transkriptionell aktiviert werden. Bisher konnte allerdings kein Transkriptionsregulator identifiziert werden, der an diese „arabox“ bindet (Brouns et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass eine *bgaH*-Reporterfusion des XacR Promotors in der Deletionsmutante von XacR eine erhöhte β -Galaktosidase Aktivität aufwies als im Wildtyp. Dies deutet auf eine Derepression in Abwesenheit des Regulators hin. Ein potentieller Repressor Bindemotiv wurde im Promotor von XacR als ein AT-reiches „inverted repeat“ identifiziert, die Mutagenese dieses Motivs in der *bgaH*-Reporterfusion des XacR Promotors führte zu einer erhöhten β -Galaktosidase Aktivität. Die erhöhten XacR Promotoraktivitäten durch die Deletion von XacR sowie die Mutagenese des potentiellen Repressorbindemotivs deuten darauf hin, dass XacR als Repressor seiner eigenen Transkription fungiert. Auch für andere IclR-like Transkriptionsregulatoren wurde gezeigt,

dass sie als Repressoren ihrer eigenen Synthese fungieren, wie das IclR aus *E. coli*. Dessen Repressorbindestelle wurde ebenfalls als eine AT-reiche Sequenz in Form eines „inverted repeat“ identifiziert (Gui et al. 1996; Pan et al. 1996; Zhou et al. 2012).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass XacR in Gegenwart von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose als transkriptioneller Aktivator für die Gene des Pentoseabbaus fungiert, dabei konnte das Bindemotiv eines Aktivators stromaufwärts der TATA-Box identifiziert werden. Eine schematische Skizze der Regulation ist in Abbildung 37A am Beispiel der D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A) dargestellt. Vermutlich bindet XacR in Gegenwart der Pentosen an das Aktivatorbindemotiv, so dass die Gene des Pentoseabbaus transkriptionell induziert werden. Für die eigene Synthese fungiert XacR als Repressor, ein potientes Repressor Bindemotiv wurde zwischen dem Transkriptionsstart von HVO_B0040, das für XacR kodiert, und der TATA-Box identifiziert. In Abwesenheit der Pentosen bindet XacR vermutlich an das Repressorbindemotiv, so dass die Transkription von XacR reprimiert wird, ohne XacR werden die Gene des Pentoseabbaus transkriptionell nicht aktiviert (Abbildung 37B). Eine direkte Bindung von XacR an das Aktivator- oder Repressormotiv wurde bisher noch nicht gezeigt.

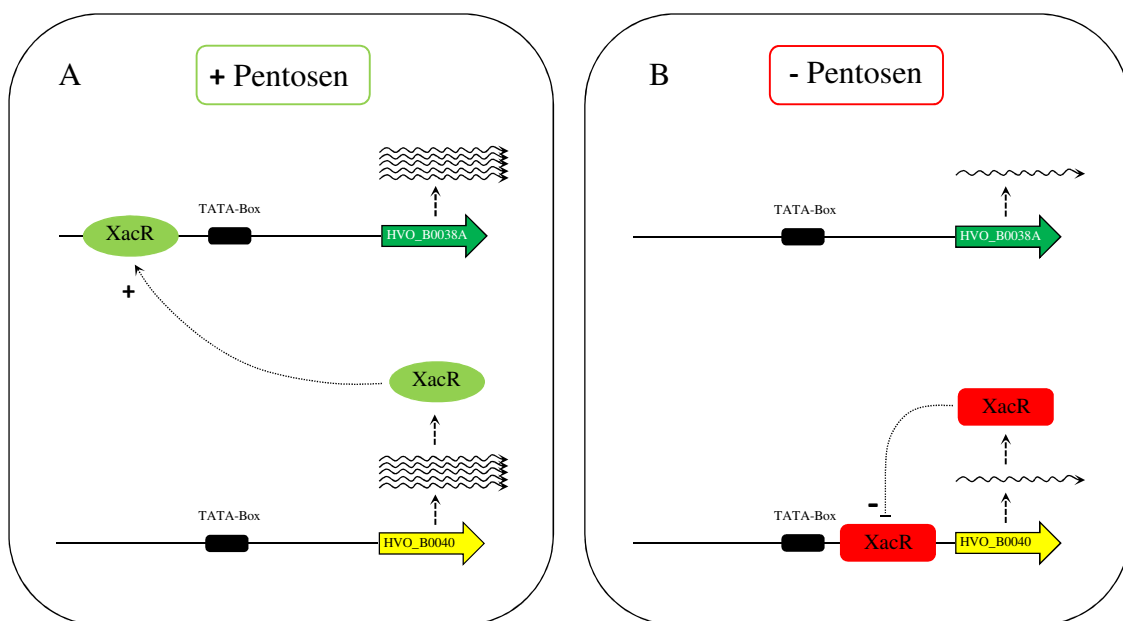


Abbildung 37 Schematische Skizze der XacR abhängigen Regulation des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in *H. volcanii* am Beispiel der D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A) in Anwesenheit (A) und Abwesenheit (B) der Pentosen D-Xylose und L-Arabinose. (A) In Anwesenheit der Pentosen werden die Gene des Pentoseabbaus XacR abhängig transkriptionell aktiviert. (B) In Abwesenheit der Pentosen reprimiert XacR (HVO_B0040) seine eigene Synthese, so dass die Gene des Pentoseabbaus nicht transkriptionell aktiviert werden. Die Transkriptmengen werden durch eine unterschiedliche Anzahl von wellenförmigen Pfeilen dargestellt.

In der Domäne der Bacteria sind Regulatoren der IclR Proteinfamilie an der Regulation von vielen Prozessen beteiligt, zum Beispiel des Stoffwechsels, Resistenzgenen, der Sporulation oder der Phytopathogenität (Molina-Henares et al. 2006). Dabei können diese Regulatoren als Repressoren und/oder Aktivatoren der Transkription von Genen fungieren (Molina-Henares et al. 2006; Zhou et al. 2012). So reprimiert das namensgebende IclR aus *E. coli* sowohl die Gene des Glyoxylatzylus als auch seine eigene Synthese (Gui et al. 1996; Pan et al. 1996). Das Protein PobR aus *Acinetobacter*, das ebenfalls zur IclR Proteinfamilie gehört, ist ein transkriptioneller Aktivator der Gene des p-Hydroxybenzoatabbaus und fungiert gleichzeitig als Repressor seiner eigenen Synthese (DiMarco and Ornston 1994). Die IclR-like Transkriptionsregulatoren sind in der Domäne der Bacteria weit verbreitet, während sie in der Domäne der Archaea ausschließlich in Haloarchaea vorkommen. Dies spricht dafür, dass das Gen von XacR in *H. volcanii* von einem lateralen Gentransfer aus Bacteria stammen könnte.

XacR aus *H. volcanii* ist ein IclR-like Transkriptionsaktivator der Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus. Neben XacR kodiert das Genom von *H. volcanii* für eine Vielzahl von homologen IclR-like Transkriptionsregulatoren, was dafür spricht, dass IclR-like Regulatoren in Haloarchaea auch andere Prozesse regulieren, wie es für Bacteria gezeigt wurde (Molina-Henares et al. 2006). In dem hyperthermophilen Crenarcheon *S. solfataricus* wurde bisher kein Transkriptionsregulator des oxidativen D-Arabinoseabbaus identifiziert (Brouns et al. 2006). Die Tatsache, dass IclR-homologe Proteine in *S. solfataricus* nicht vorkommen, spricht dafür, dass der oxidative Weg von einem Regulator einer anderen Proteinfamilie reguliert wird. Diese Regulation eines ähnlichen Abbauweges durch Regulatoren anderer Proteinfamilien wurde für *Caulobacter crescentus* gezeigt, dabei werden die Gene des oxidativen D-Xyloseabbaus zu α -Ketoglutarat von einem Repressor der LacI-Familie reguliert (Stephens et al. 2007b). Unterschiedliche Regulatoren und Regulationsmechanismen wurden auch bei der transkriptionellen Regulation des klassischen D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus in Bacteria beschrieben. In *Escherichia coli* werden die Gene des D-Xylose- und L-Arabinoseabbaus von XylR beziehungsweise AraC aktiviert, während in *Bacillus subtilis* die entsprechenden Gene von XylR beziehungsweise AraR reprimiert werden (Song and Park 1997; Miyada et al. 1984; Dahl et al. 1994; Mota et al. 1999).

6.2 D-Xylose- und D-Riboseabbau in *Haloarcula marismortui*

In *H. marismortui* katalysiert eine induzierbare bifunktionelle Dehydrogenase die NADP⁺ abhängige Oxidation von D-Xylose und D-Ribose (Johnsen and Schönheit 2004; AG Schönheit). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Zellextrakte aus D-Xylose und D-Ribose gewachsenen Zellen die Bildung von α -Ketoglutarat aus D-Xylonat beziehungsweise D-Ribonat katalysierten. Außerdem wurden die Enzymaktivitäten einer D-Xylonat-Dehydratase, einer D-Ribonat-Dehydratase und einer induzierbaren α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase nachgewiesen. Durch die native Reinigung dieser Proteine konnten die kodierenden Gene identifiziert werden, anschließend wurden die Proteine überexprimiert und charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass *H. marismortui* die Pentosen D-Xylose und D-Ribose oxidativ zu α -Ketoglutarat abbaut.

6.2.1 D-Xylonat-Dehydratase und D-Ribonat-Dehydratase

Die Enzyme D-Xylonat-Dehydratase und D-Ribonat-Dehydratase wurden partiell gereinigt und die kodierenden Gene als *rrnAC0575* und *rrnAC3032* identifiziert. Diese Gene sind annotiert als Dehydratasen, die auf Grund der Aminosäuresequenz der Mandelat-Racemase (MR)-like-Subfamilie der Enolase Superfamilie zugeordnet werden. Zu dieser (MR)-like-Subfamilie wurden auch die archaeellen Dehydratasen des oxidativen Pentoseabbaus, die D-Arabinoat-Dehydratase aus *Sulfolobus solfataricus* und die D-Xylonat-Dehydratase aus *Haloferax volcanii*, zugeordnet, genau wie die D-Gluconat-Dehydratasen des D-Glucoseabbaus aus *Sulfolobus solfataricus*, *Haloferax volcanii* und *Picrophilus torridus* (Brouns et al. 2006; Johnsen et al. 2009; Lambie et al. 2004; Kim and Lee 2005; Diplomarbeit Jan-Moritz Sutter, 2010; Reher et al. 2010). Neben der MR-like-Subfamilie besteht die Enolase Superfamilie aus drei weiteren Subfamilien, der Enolase-like-, der MLE-like- (muconate lactonizing enzyme) und der MAL-like- (3-methylaspartate ammonia lyase) Subfamilie. Alle Mitglieder der Enolase Superfamilie weisen den gleichen Mechanismus der Dehydratisierung auf. Dabei wird ein α -Proton von einem Carboxylat Anion abgespalten und ein enolatisches Intermediat gebildet, das von einem divalenten Kation stabilisiert wird (Gerlt et al. 2005). Bakterielle Vertreter der MR-like-Subfamilie sind die Glucarate-Dehydratasen aus *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* und *E. coli* sowie die Galactonat-Dehydratase aus *E. coli* (Babbitt et al. 1996; Hubbard et al. 1998).

Die bakteriellen Dehydratasen des oxidativen Pentoseabbaus, die L-Arabinat-Dehydratase aus *A. brasiliense* und die putative D-Xylonat-Dehydratase aus *C. crescentus*, werden der Dihydroxyacid dehydratase/ 6-Phosphogluconate dehydratase (ILVD/ EDD) Superfamilie zugeordnet, genau wie die bakteriellen D-Gluconat-Dehydratasen, die den ersten Schritt des Abbaus von D-Gluconat zu Pyruvat katalysieren (Watanabe et al. 2006b; Stephens et al. 2007a; Kim and Lee 2008).

Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte D-Ribonat-Dehydratase (RAD) und die D-Gluconat-/ D-Xylonat-Dehydratase (GAD/ XAD) aus *H. marismortui* zeigten vergleichbare molekulare und biochemische Eigenschaften wie bereits charakterisierte archaeele Dehydratasen, zum Beispiel der D-Arabinat-Dehydratase (AraAD) aus *S. solfataricus*, der D-Xylonat-Dehydratase (XAD) aus *H. volcanii* sowie den D-Gluconat-Dehydratasen (GAD) aus *S. solfataricus*, *H. volcanii* und *P. torridus* (Tabelle 16) (Brouns et al. 2006; Johnsen et al. 2009; Lambie et al. 2004; Kim and Lee 2005; Diplomarbeit Jan-Moritz Sutter, 2010; Reher et al. 2010). Alle Dehydratasen wiesen eine homooctamere Struktur (α_8) auf, dabei betrugen die molekularen Massen der Enzyme etwa 340 kDa und molekulare Massen der Untereinheiten von etwa 45 kDa. Eine Ausnahme dazu bildet die GAD aus *S. solfataricus*, die in zwei Publikationen entweder als homooctamer oder als monomer charakterisiert wurde (Kim and Lee 2005; Lambie et al. 2004). Die RAD aus *H. marismortui* zeigte eine hohe Spezifität für die Umsetzung von D-Ribonat, solch eine hohe Substratspezifität wurde auch für die AraAD aus *S. solfataricus* und die GAD aus *H. volcanii* beschrieben. Im Gegensatz dazu setzte die GAD/ XAD aus *H. marismortui* neben D-Xylonat auch D-Gluconat um, wie es für die XAD aus *H. volcanii* gezeigt wurde. Allerdings setzte die XAD aus *H. volcanii* die beiden Zuckersäuren mit einer ähnlich hohen Enzymaktivität um, während die GAD/ XAD aus *H. marismortui* D-Gluconat mit einer 100-fach höheren spezifischen Aktivität umsetzt, als D-Xylonat. Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei der GAD/ XAD auch um die funktionelle D-Gluconat-Dehydratase handeln könnte. Durch die native Reinigung der D-Gluconat-Dehydratase (GAD) aus D-Glucose gewachsenen *H. marismortui* Zellen konnte bestätigt werden, dass das Gen *rrnAC0575* auch für die funktionelle D-Gluconat-Dehydratase kodiert. Für *S. solfataricus* und *P. torridus* wurde gezeigt, dass die GADs nicht nur am D-Glucoseabbau sondern auch am D-Galactoseabbau beteiligt sind, so setzten sie neben D-Gluconat auch D-Galactonat um.

Tabelle 16 Molekulare und katalytische Eigenschaften archaeeller Dehydratasen der Enolase Superfamilie. D-Ribonat-Dehydratase (rrnAC3032) und D-Gluconat-/D-Xylonat-Dehydratase (rrnAC0575) aus *H. marismortui*, D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A) und D-Gluconat-Dehydratase (HVO_1488) aus *H. volcanii* (Johnsen et al. 2009; Diplomarbeit Jan-Moritz Sutter, 2010), D-Arabinat-Dehydratase (SSO3124) und D-Gluconat-Dehydratase (SSO3198) aus *S. solfataricus* (Brouns et al. 2006; Lamble et al. 2004; Kim and Lee 2005), sowie die D-Gluconat-Dehydratase (PTO0485) aus *P. torridus* (Reher et al. 2010). [...] Werte von Lamble et al., 2004. * Kalkuliert (www.halolex.mpg.de). ¹ = Aktivität bei einer Konzentration von 10 mM bestimmt. ² = Einheit (s⁻¹). ³ = Einheit (s⁻¹ mM⁻¹). ⁴ = U/mg < 3 %. - = keine Angabe, nm = nicht messbar.

	<i>H. maris-</i> <i>mortui</i>	<i>H. maris-</i> <i>mortui</i>	<i>H. volcanii</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>H. volcanii</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>P. torridus</i>
Enzym	RAD	GAD/XAD	XAD	AraAD	GAD	GAD	GAD
Molekulare Masse (kDa)							
Natives Enzym	320 ± 30	328 ± 30	340 ± 30	340	312 ± 30	350 [48]	340
Untereinheit	44,2*	47*	45,5	42,4	45,8*	44 [45]	44
Oligomere Struktur	α_8	α_8	α_8	α_8	α_8	α_8 [α_1]	α_8
Apparenter V_{max} (U/mg)							
D-Ribonat	0,36	nm	-	-	-	nm -	-
D-Xylonat	nm	0,03 ¹	1,1	-	nm	nm -	nm
D-Arabinat	-	-	-	1,8 ²	-	nm -	-
D-Gluconat	nm	3,75 ¹	1,1	nm	24,5	0,15 [6,65 ³]	15
D-Galactonat	nm	nm	nm	-	nm	nm ⁴ [1,33 ³]	1

Ein phylogenetischer Stammbaum der charakterisierten, archaeellen Zuckersäure-Dehydratasen ist in Abbildung 38 dargestellt. Dabei bilden die charakterisierten Dehydratasen zusammen mit homologen Proteinen vier phylogenetische Gruppen. In der Ausbildung der unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen spiegeln sich die unterschiedlichen Substratspezifitäten wieder. Die in dieser Arbeit identifizierte D-Ribonat-Dehydratase (RAD), kodiert von rrnAC3032, bildet zusammen mit homologen Proteinen eine eigene physiologische Gruppe. Die zweite distinkte Gruppe enthält die charakterisierte D-Arabinat-Dehydratase (AraAD) aus *S. solfataricus* (SSO3124) sowie homologe Proteine. Die dritte phylogenetische Gruppe wird von den charakterisierten GADs aus *S. solfataricus* (SSO3198) und *P. torridus* (PTO0485) sowie homologen Proteinen gebildet (Lamble et al. 2004; Reher et al. 2010). Die GADs aus *S. solfataricus* und *P. torridus* setzten beide neben D-Gluconat auch D-Galactonat um, so dass es sich bei den homologen Proteinen um D-Gluconat- und/ oder D-Galactonat-Dehydratasen (GAD/ GalAD) handeln könnte. Die vierte phylogenetische

Gruppe enthält die in dieser Arbeit identifizierte D-Gluconat-/ D-Xylonat-Dehydratase (GAD/ XAD) aus *H. marismortui*, kodiert von rrnAC0575, die charakterisierten Dehydratasen aus *H. volcanii*, D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A) und D-Gluconat-Dehydratase (HVO_1488), sowie homologe Proteine (Johnsen et al. 2009; Diplomarbeit Jan-Moritz Sutter, 2010).

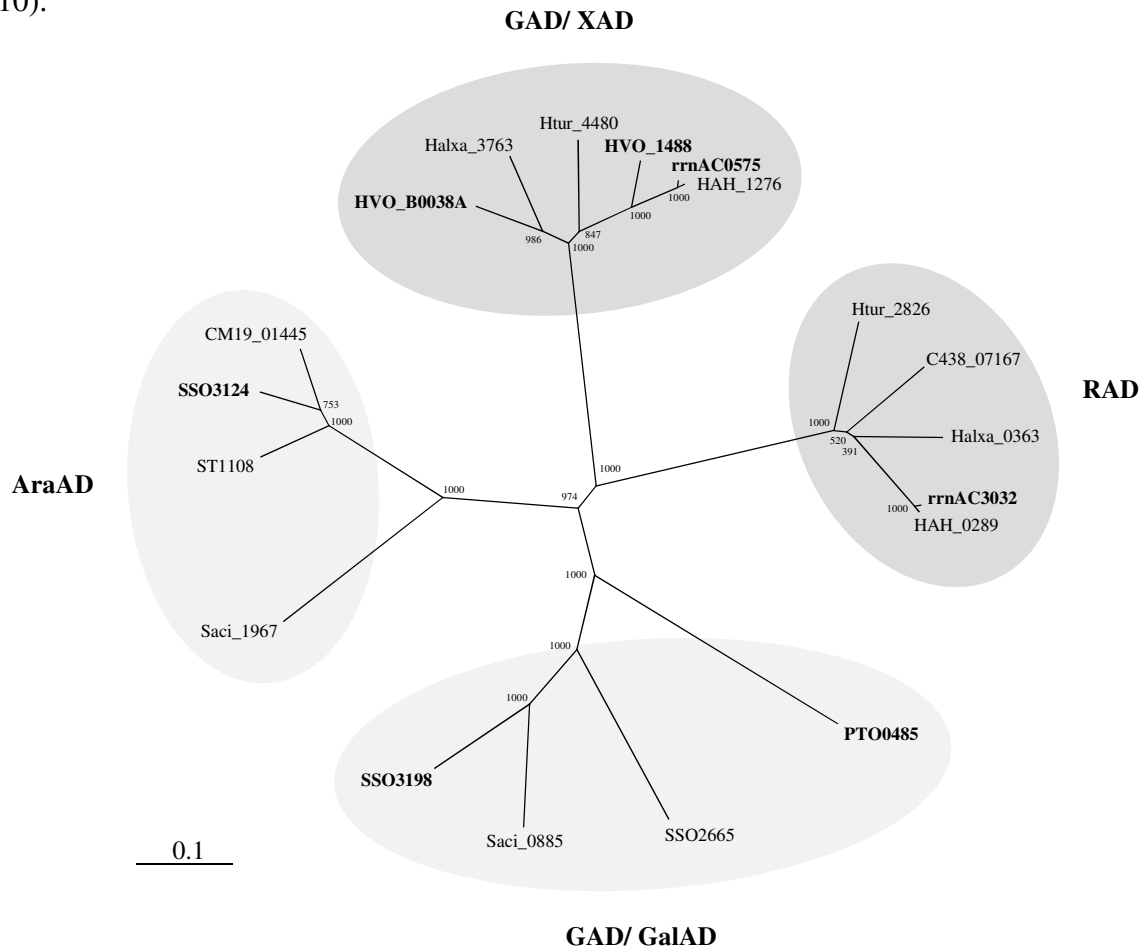


Abbildung 38 Phylogenetische Einordnung von ausgewählten Zuckersäure-Dehydratasen der Enolase Superfamilie. Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007), wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste. Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure Sequenzalignment, das mit ClustalX unter der Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Die Sequenzen der folgenden charakterisierten Dehydratasen wurden verwendet und fett markiert: D-Xylonat-Dehydratase aus *Haloferax volcanii* (HVO_B0038A), D-Gluconat-Dehydratase aus *H. volcanii* (HVO_1488), D-Gluconat-/ D-Xylonat-Dehydratase aus *Haloarcula marismortui* (rrnAC0575), D-Ribonat-Dehydratase aus *H. marismortui* (rrnAC3032), D-Gluconat-Dehydratase aus *Picrophilus torridus* (PTO0485), D-Gluconat-Dehydratase aus *Sulfolobus solfataricus* (SSO3198) und D-Arabinat-Dehydratase aus *S. solfataricus* (SSO3124). Die Sequenzen von homologen Proteinen aus folgenden Organismen wurden verwendet: *Halopiger xanaduensis* (Halxa_3763, Halxa_0363), *Haloterrigena turkmenica* (Htur_4480, Htur_2826), *Haloarcula hispanica* (HAH_1276, HAH_0289), *Haloferax denitrificans* (C438_07167), *Sulfolobus solfataricus* (SSO2665), *Sulfolobus acidocaldarius* (Saci_0885, Saci_1967), *Sulfolobus tokodaii* (ST1108), *Candidatus Acidianus copahuensis* (CM19_01445). Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

6.2.2 α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase

Die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH) katalysiert die Umsetzung von α -Ketoglutarat-Semialdehyd zu α -Ketoglutarat. Die KGSADH wurde partiell gereinigt und das kodierende Gen *rrnAC3036* identifiziert, dieses Gen kodiert für ein Protein der Aldehyd-Dehydrogenase-Familie (Aldedh, PF00171). Die Aminosäuresequenz der KGSADH aus *H. marismortui* zeigte eine hohe Sequenzidentität zu den bereits charakterisierten KGSADHs aus *H. volcanii* (62 %), *S. solfataricus* (42 %) und *A. brasiliense* (33 %) (Johnsen et al. 2009; Brouns et al. 2006; Watanabe et al. 2006a). In der Aminosäuresequenz der KGSADH aus *H. marismortui* konnten spezifische Aldehyd-Dehydrogenase Motive (Prosite) identifiziert werden. In dem ersten Konsensus Motiv ist ein Glutamat konserviert, während in dem zweiten Motiv ein Cystein konserviert ist (PS00687, PS00070). Die konservierten Reste des Glutamats und des Cysteins stellen in einer Aldehyd-Dehydrogenase aus *Homo sapiens* die katalytischen Reste dar (Hempel et al. 1993). Die rekombinante α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH) aus *H. marismortui* zeigte vergleichbare molekulare und biochemische Eigenschaften wie die bereits charakterisierten KGSADHs aus *H. volcanii*, *S. solfataricus* und *A. brasiliense*. In allen drei Organismen katalysieren die KGSADHs den letzten Schritt des jeweiligen oxidativen Pentoseabbaus (Johnsen et al. 2009; Brouns et al. 2006; Watanabe et al. 2006a). Diese KGSADHs zeigten alle eine homotetramere Struktur (α_4) mit einem Molekulargewicht des Enzyms von etwa 210 kDa und eine molekulare Masse der Untereinheiten von etwa 52 kDa. Des Weiteren katalysierten alle charakterisierten KGSADHs die Umsetzung von α -Ketoglutarat-Semialdehyd zu α -Ketoglutarat und zeigten ein breites Substratspektrum. So wurden auch eine Vielzahl andere Aldehyde umgesetzt, zum Beispiel Glutardialdehyd und Succinat-Semialdehyd (Johnsen et al. 2009; Brouns et al. 2006; Watanabe et al. 2006a).

6.3 D-Xyloseabbau in *Halorhabdus utahensis*

In Extrakten von D-Xylose gewachsenen *H. utahensis* Zellen konnten die Aktivitäten der Dehydrogenasen des oxidativen D-Xyloseabbaus, D-Xylose-Dehydrogenase und α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase, nicht nachgewiesen werden. Dagegen wurden die Aktivitäten einer D-Xylose-Isomerase und einer D-Xylulose-Kinase gemessen. Dies spricht dafür, dass *H. utahensis* D-Xylose, wie die meisten Bacteria, zu D-Xylulose-5-Phosphat abbaut und nicht oxidativ zu α -Ketoglutarat, wie *H. volcanii* und *H. marismortui*. Die Extraktmessungen sind in Übereinstimmung mit einer kürzlich durchgeführten Genomanalyse, bei der die Gene Huta_2443 und Huta_2446 als die kodierenden Gene der D-Xylose-Isomerase beziehungsweise D-Xylulose-Kinase postuliert wurden (Anderson et al. 2011). Das Gen Huta_2443 wurde in den Vektor pTA963 kloniert, anschließend wurde das Protein überexprimiert, gereinigt und als D-Xylose-Isomerase charakterisiert.

6.3.1 D-Xylose-Isomerase

Das apparente Molekulargewicht der D-Xylose-Isomerase konnte mittels Gelfiltration mit 175 ± 15 kDa bestimmt werden, was bei einem kalkulierten Molekulargewicht von 50,2 kDa auf eine homotrimere (α_3) oder homotetramere (α_4) Struktur hindeuten könnte. Die homotetramere (α_4) Struktur ist die verbreitetste Form der D-Xylose-Isomerase (XI), so zeigten auch die XIs aus *B. thermoantarcticus*, *L. reuteri* und *T. neapolitana* eine homotetramere Form, dabei wiesen die Enzyme ein Molekulargewicht von 190 bis 200 kDa auf. Einige wenige XIs wurden als homotrimere (α_3) Enzyme beschrieben, wie die XI aus *B. adolescentis*, die ein Molekulargewicht von 168 kDa aufwies. Die XI aus *H. utahensis* katalysierte die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose und mit einer deutlich geringeren katalytischen Effizienz auch die Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose. Die bakteriellen XIs zeigen ähnliche katalytische Eigenschaften. Neben der Umsetzung von D-Xylose zu D-Xylulose katalysieren sie auch mit einer geringeren katalytischen Effizienz die Umsetzung von D-Glucose zu D-Fructose (Lama et al. 2001; Staudigl et al. 2014; Vieille et al. 1995; Kawai et al. 1994). Diese Umsetzung von D-Glucose zu D-Fructose wird in der Getränkemittelindustrie verwendet. Dabei wird aus Stärke mit Hilfe von D-Xylose-Isomerasen ein Sirup aus D-Glucose und D-Fructose hergestellt, um Getränke mit D-Fructose zu süßen.

Aminosäuresequenzvergleiche der D-Xylose-Isomerase aus *H. utahensis* ergaben in der Domäne der Archaea nur einen Hit in *Halorhabdus timatea* (94 %), während in der Domäne der Bacteria eine Vielzahl von homologen Proteinen gefunden werden konnte. Die charakterisierten XIs aus *B. thermoantarcticus*, *T. neapolitana*, *L. reuteri* und *B. adolescentis* zeigten eine Identität der Aminosäuresequenz von 51 bis 63 %. Interessanterweise konnten in der Domäne der Eukarya, in Tieren und Pflanzen sowie einem Pilz, auch D-Xylose-Isomerasen nachgewiesen werden (Ding et al. 2009; Harhangi et al. 2003).

Die Charakterisierung der D-Xylose-Isomerase aus *H. utahensis* ist der erste Nachweis einer funktionellen D-Xylose-Isomerase in der Domäne der Archaea. Die D-Xylose-Isomerase kommt in der Domäne der Archaea ausschließlich in *Halorhabdus* vor, dies deutet darauf hin, dass dieses Enzym von einem lateralen Gentransfer aus Bacteria stammen könnte.

6.4 Zusammenfassung der Pentoseabbauwege in halophilen Archaea

6.4.1 Abbauwege und Enzyme

Die in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten Gene und Enzyme des Pentoseabbaus in Haloarchaea lassen sich, zusammen mit Genominformationen und bisherigen Analysen, in einer Abbildung zusammenfassen (Abbildung 39):

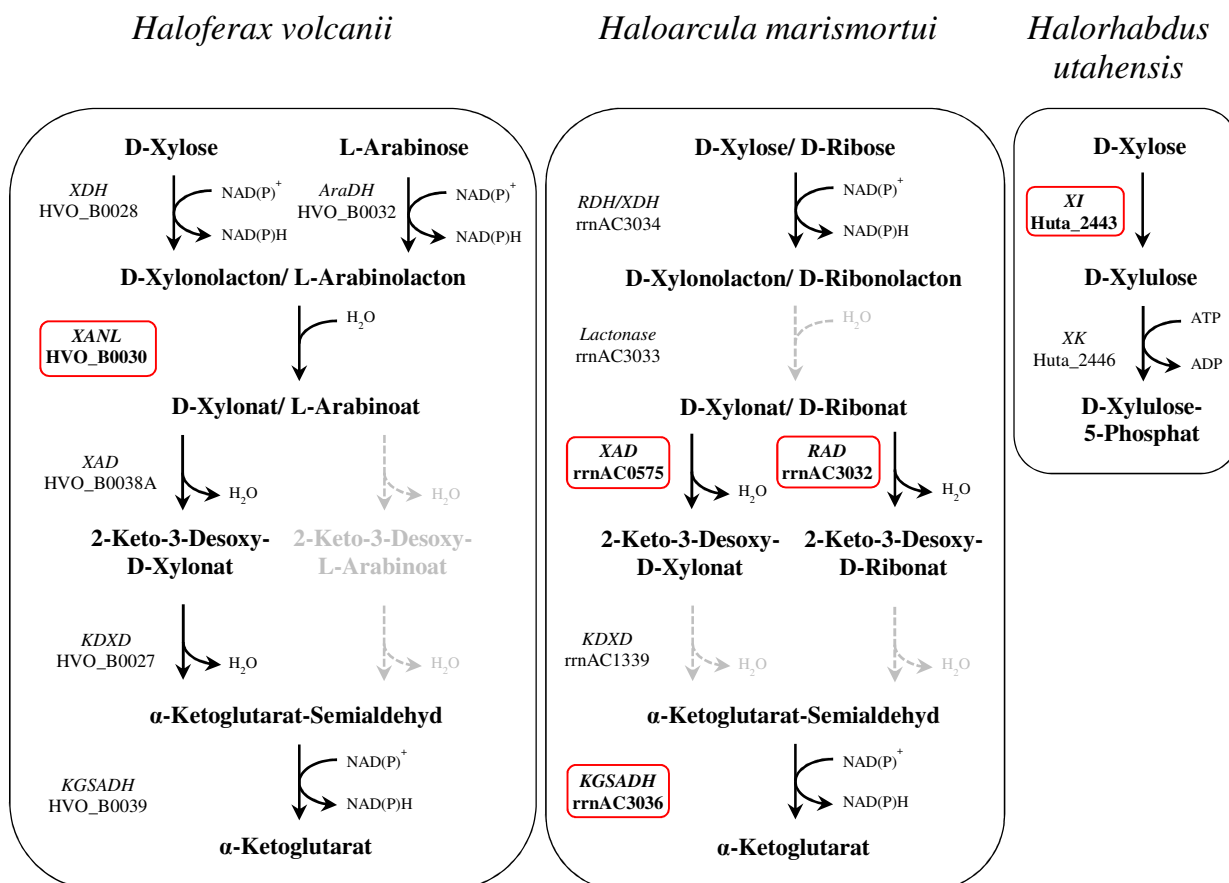


Abbildung 39 Zusammenfassung des Pentoseabbaus in *Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui* und *Halorhabdus utahensis* (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013; Johnsen and Schönheit 2004; AG Schönheit; Anderson et al. 2011). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme sind fett gedruckt und rot umrandet. D-Xylose-Dehydrogenase (XDH), L-Arabinose-Dehydrogenase (AraDH), D-Xylonolacton-/L-Arabinolactonase (XANL), D-Xylonat-Dehydratase (XAD), 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase (KDXD), α-Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH), D-Ribose-/D-Xylose-Dehydrogenase (RDH/XDH), D-Ribonat-Dehydratase (RAD), D-Xylose-Isomerase (XI), D-Xylulose-Kinase (XK).

H. volcanii baut D-Xylose und L-Arabinose oxidativ zu α -Ketoglutarat ab, dabei wird der initiale Schritt von zwei distinkten Dehydrogenasen katalysiert. Die D-Xylose-Dehydrogenase (HVO_B0028) katalysiert die Umsetzung von D-Xylose zu D-Xylonolacton, während die L-Arabinose-Dehydrogenase (HVO_B0032) die Umsetzung von L-Arabinose zu L-Arabinolacton katalysiert. Die gebildeten Lactone werden von der D-Xylono-/L-Arabinolactonase (HVO_B0030) zu den entsprechenden Säuren hydrolysiert. An der weiteren Umsetzung von D-Xylonat beziehungsweise L-Arabinat zu α -Ketoglutarat sind die gleichen Enzyme, die D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0038A), die 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase (HVO_B0027) und die α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (HVO_B0039), essentiell beteiligt (Johnsen et al. 2009; Johnsen et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die D-Xylose-Dehydrogenase und die L-Arabinose-Dehydrogenase die Umsetzung von D-Xylose beziehungsweise L-Arabinose zu den entsprechenden Lactonen katalysieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Umsetzung dieser Lactone zu den entsprechenden Säuren von der D-Xylono-/L-Arabinolactonase katalysiert wird. Die rekombinante Lactonase wurde gereinigt und charakterisiert. Außerdem wurde gezeigt, dass XacR als transkriptioneller Aktivator der Gene des Pentoseabbaus fungiert.

In *H. marismortui* wird der erste Schritt des oxidativen D-Ribose- und D-Xyloseabbaus von einer bifunktionellen D-Ribose-/D-Xylose-Dehydrogenase (rrnAC3034) katalysiert (Johnsen and Schönheit 2004; AG Schönheit). Eine putative Lactonase der β -Lactamase Proteinfamilie (rrnAC3033) hydrolysiert vermutlich die gebildeten Lactone zu den entsprechenden Säuren (Brouns et al. 2006). Das D-Ribonat wird von einer spezifischen D-Ribonat-Dehydratase (RAD, kodiert von rrnAC3032) zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Ribonat umgesetzt, während das D-Xylonat von einer D-Xylonat-Dehydratase (XAD, kodiert von rrnAC0575) zu 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat umgesetzt wird. Die zweite Dehydratisierung dieser Zuckersäuren zu α -Ketoglutarat-Semialdehyd wird vermutlich von einer Dehydratase (KDXD, kodiert von rrnAC1339) katalysiert. Die Umsetzung des Aldehyds zu α -Ketoglutarat wird von der α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (rrnAC3036) katalysiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die α -Ketoglutarat Bildung aus D-Ribonat beziehungsweise D-Xylonat gezeigt. Die an dieser Umsetzung beteiligten Enzyme, RAD, XAD und KGSADH wurden nativ gereinigt und die kodierenden Gene identifiziert. Anschließend wurden die rekombinanten Enzyme gereinigt und charakterisiert.

H. utahensis setzt D-Xylose durch eine D-Xylose-Isomerase (Huta_2443) zu D-Xylulose um, anschließend folgt eine Phosphorylierung durch die D-Xylulose-Kinase (Huta_2446) zu

D-Xylulose-5-Phosphat. In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivitäten dieser Enzyme in Extrakten von D-Xylose gewachsenen Zellen nachgewiesen. Die D-Xylose-Isomerase, kodiert von Huta_2443, wurde in *H. volcanii* überexprimiert und das gereinigte Protein charakterisiert.

6.4.2 Genominformationen zum Pentoseabbau in halophilen Archaea

Mit Hilfe von BlastP-Analysen konnten die Gene des oxidativen D-Xylose-, L-Arabinose- und D-Riboseabbaus auch in den Genomen von weiteren Haloarchaeen identifiziert werden, zum Beispiel *Haloferax lucentense*, *Haloferax denitrificans*, *Haloarcula hispanica*, *Haloterrigena turkmenica* und *Halopiger xanaduensis* (Abbildung 40A). In den *Haloferax spec.* liegen diese Gene innerhalb eines Genclusters in einer sehr ähnlichen Genabfolge, wobei homologe Gene in identischen Farben dargestellt sind. Im Gegensatz dazu weisen die *Haloarcula spec.* mehrere Gencluster auf, die unterschiedlich angeordnet sind (siehe Gennummern). In *Haloterrigena turkmenica* und *Halopiger xanaduensis* liegen die Gene ebenfalls in mehreren Genclustern. Zu der in *H. marismortui* identifizierten D-Ribonat-Dehydratase (RAD) gibt es homologe Proteine in *Haloferax denitrificans*, *H. turkmenica*, *H. hispanica* und *H. xanaduensis* mit Identitäten der Aminosäuresequenz von 78 %, 66 %, 91 % beziehungsweise 79 %. Die Genome von *Haloferax lucentense* und *Haloferax volcanii* weisen hingegen keine RAD homologen Proteine (Identität > 35 %) auf. Das Vorhandensein eines RAD homologen Proteins in der Genomumgebung der hypothetischen Gene des D-Xyloseabbaus spricht dafür, dass diese Organismen D-Ribose abbauen, wie es für *H. marismortui* beschrieben wurde. Die Genome der *Haloferax spec.* sowie das von *H. turkmenica* kodieren für homologe Proteine der L-Arabinose-Dehydrogenase, was darauf hindeutet, dass diese Organismen, wie für *Haloferax volcanii* gezeigt, L-Arabinose abbauen. Weiterhin weisen alle ausgewählten Organismen XacR homologe Proteine in direkter Nähe zu den (hypothetischen) Genen des Pentoseabbaus auf. Dies deutet darauf hin, dass die transkriptionelle Regulation der Gene des Pentoseabbaus in diesen Organismen vermutlich wie in *H. volcanii* abläuft.

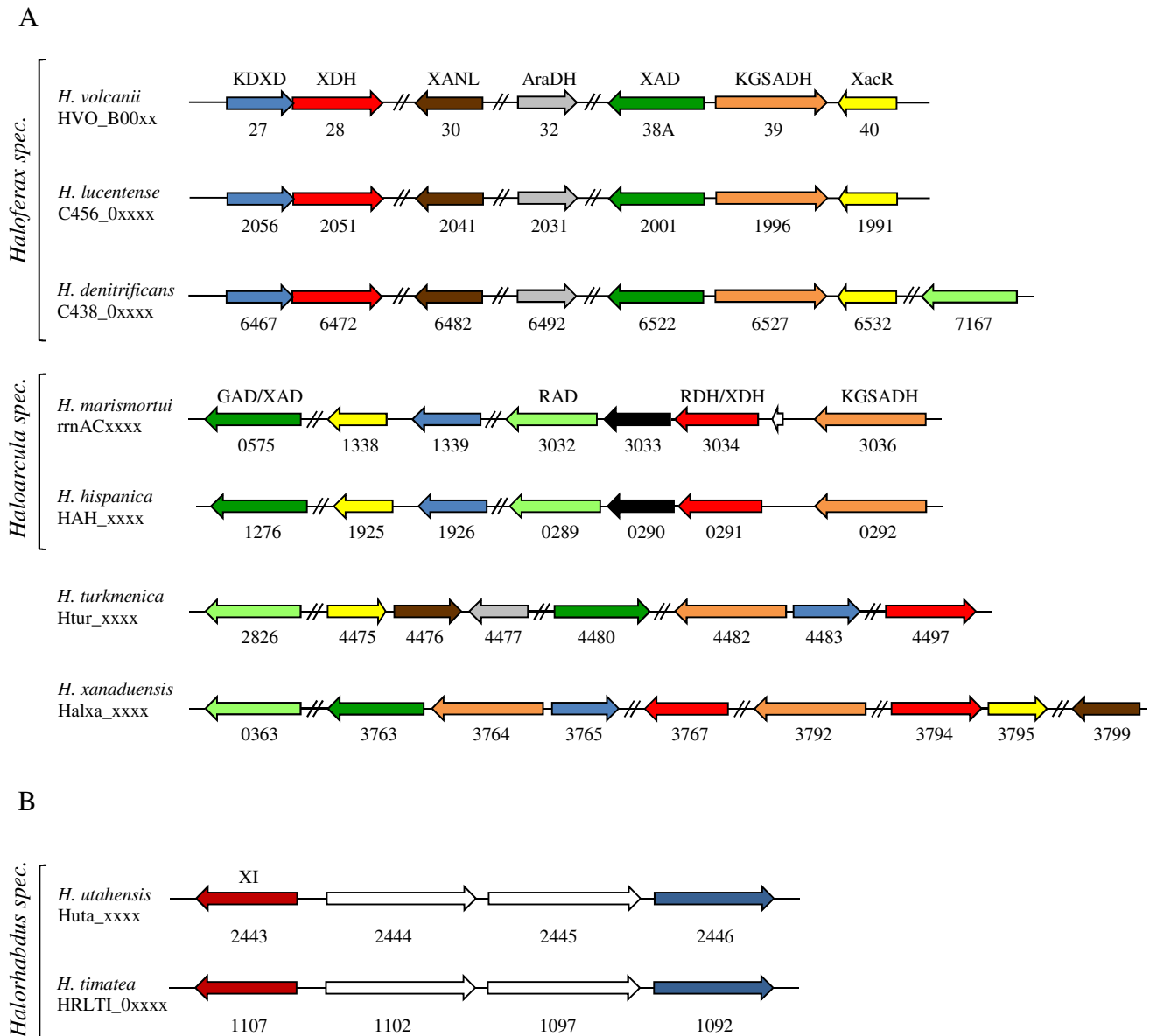


Abbildung 40 Genomumgebung der am oxidativen Pentoseabbau beteiligten Gene in *Haloferax volcanii* und *Haloarcula marismortui* sowie der homologen Gene in *Haloferax lucentense*, *Haloferax denitrificans*, *Haloarcula hispanica*, *Haloterrigena turkmenica* und *Halopiger xanaduensis* (A), die Genomumgebung der am D-Xyloseabbau beteiligten Gene in *Halorhabdus utahensis* sowie der homologen Gene in *Halorhabdus timatea* (B). (A) 2-Keto-3-Desoxy-D-Xylonat-Dehydratase (KDXD), D-Xylose-Dehydrogenase (XDH, rot), D-Xylono-/ L-Arabinolactonase (XANL, dunkelbraun), L-Arabinose-Dehydrogenase (AraDH, grau), D-Xylonat-Dehydratase (XAD, dunkelgrün), α -Ketoglutarat-Semialdehyd-Dehydrogenase (KGSADH, orange), Transkriptionsregulator XacR (gelb) und D-Ribonat-Dehydratase (RAD, hellgrün). Eine putative Lactonase aus *H. marismortui* wird von rrmAC3033 kodiert (schwarz). (B) Huta_2443 kodiert für die D-Xylose-Isomerase (XI, dunkelrot), Huta_2446 kodiert für eine hypothetische D-Xylulose-Kinase (dunkelblau). Über den Genen, deren kodierende Proteine charakterisiert wurden, steht die Abkürzung des Proteinnamens.

Zusammenfassend zeigen die Genominformationen, dass die Pentosen nicht nur in *H. volcanii* und *H. marismortui* oxidativ zu α -Ketoglutarat abgebaut werden, sondern vermutlich auch in anderen Haloarchaea. Im Gegensatz zu diesen Haloarchaea baut *Halorhabdus utahensis* D-Xylose, wie die meisten Bacteria, mittels D-Xylose-Isomerase und D-Xylulose-Kinase zu D-Xylulose-5-Phosphat ab. Die kodierenden Gene dieser Enzyme liegen im Genom von *H. utahensis* in direkter Nähe zueinander (Abbildung 40B). Die D-Xylose-Isomerase konnte in der Domäne der Archaea nur noch im Genom von *Halorhabdus timatea* gefunden werden. Dabei weisen die Gene eine vergleichbare Anordnung wie in *H. utahensis* auf. Durch das Vorhandensein der D-Xylose-Isomerase unterscheidet sich *Halorhabdus* von allen bisher beschriebenen Archaea.

7 Literaturverzeichnis

- Aizawa,S., Senda,M., Harada,A., Maruyama,N., Ishida,T., Aigaki,T., Ishigami,A. and Senda,T. (2013) Structural basis of the gamma-lactone-ring formation in ascorbic acid biosynthesis by the senescence marker protein-30/gluconolactonase. *PLoS. ONE*. **8**, e53706.
- Allers,T., Barak,S., Liddell,S., Wardell,K. and Mevarech,M. (2010) Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol* **76**, 1759-1769.
- Allers,T. and Mevarech,M. (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 58-73.
- Allers,T., Ngo,H.P., Mevarech,M. and Lloyd,R.G. (2004) Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 943-953.
- Anderson,I., Scheuner,C., Göker,M., Mavromatis,K., Hooper,S.D., Porat,I., Klenk,H.P., Ivanova,N. and Kyrpides,N. (2011) Novel insights into the diversity of catabolic metabolism from ten haloarchaeal genomes. *PLoS. ONE*. **6**, e20237.
- Ao,X., Li,Y., Wang,F., Feng,M., Lin,Y., Zhao,S., Liang,Y. and Peng,N. (2013) The *Sulfolobus* initiator element is an important contributor to promoter strength. *J. Bacteriol.* **195**, 5216-5222.
- Avron,M. (1986) The osmotic components of halotolerant algae. *Trends in Biochemical Sciences* **11**, 5-6.
- Babbitt,P.C., Hasson,M.S., Wedekind,J.E., Palmer,D.R., Barrett,W.C., Reed,G.H., Rayment,I., Ringe,D., Kenyon,G.L. and Gerlt,J.A. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α -protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35**, 16489-16501.
- Bell,S.D. and Jackson,S.P. (1998) Transcription in Archaea. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 41-51.
- Bitan-Banin,G., Ortenberg,R. and Mevarech,M. (2003) Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J. Bacteriol.* **185**, 772-778.
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenneis,M., Hering,O., Lange,C. and Soppa,J. (2007) Experimental characterization of *Cis*-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS. Genet.* **3**, e229.

- Brinkman,A.B., Bell,S.D., Lebbink,R.J., De Vos,W.M. and Van der Oost,J. (2002) The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like Protein LysM Regulates Lysine Biosynthesis in Response to Lysine Availability. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, No. **33**, 29537-29549.
- Brochier-Armanet,C., Boussau,B., Gribaldo,S. and Forterre,P. (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 245-252.
- Brock,T.D., Brock,K.M., Belly,R.T. and Weiss,R.L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**, 54-68.
- Brouns,S.J., Walther,J., Snijders,A.P., van de Werken,H.J., Willemen,H.L., Worm,P., de Vos,M.G., Andersson,A., Lundgren,M., Mazon,H.F., van den Heuvel,R.H., Nilsson,P., Salmon,L., De Vos,W.M., Wright,P.C., Bernander,R. and van der,O.J. (2006) Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways: evidence for enzyme recruitment. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 27378-27388.
- Brückner,J. (1955) Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction. *Biochem J* **60**, 200-205.
- Buchert,J. and Viikari,L. (1988) Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**, 375-379.
- Burggraf,S., Huber,H. and Stetter,K.O. (1997) Reclassification of the crenarchael orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 657-660.
- Chen,C.N., Chin,K.H., Wang,A.H. and Chou,S.H. (2008) The first crystal structure of gluconolactonase important in the glucose secondary metabolic pathways. *J Mol. Biol.* **384**, 604-614.
- Cline,S.W., Schalkwyk,L.C. and Doolittle,W.F. (1989) Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *J. Bacteriol.* **171**, 4987-4991.
- Connaris,H., Chaudhuri,J.B., Danson,M.J. and Hough,D.W. (1999) Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **64**, 38-45.
- Dahl,M.K., Degenkolb,J. and Hillen,W. (1994) Transcription of the xyl operon is controlled in *Bacillus subtilis* by tandem overlapping operators spaced by four base-pairs. *J. Mol. Biol.* **243**, 413-424.
- Dahlke,I. and Thomm,M. (2002) A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Res.* **30**, 701-710.

- Dambeck,M. and Soppa,J. (2008) Characterization of a *Haloferax volcanii* member of the enolase superfamily: deletion mutant construction, expression analysis, and transcriptome comparison. *Arch Microbiol* **190**, 341-353.
- David,J.D. and Wiesemeyer,H. (1970) Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **201**, 497-499.
- De Rosa,M. and Gambacorta,A. (1988) The lipids of archaeobacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153-175.
- Decker,K.B. and Hinton,D.M. (2013) Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 113-139.
- Dennis,P.P. and Shimmin,L.C. (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 90-104.
- DiMarco,A.A. and Ornston,L.N. (1994) Regulation of p-hydroxybenzoate hydroxylase synthesis by PcbR bound to an operator in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **176**, 4277-4284.
- Ding,M., Teng,Y., Yin,Q., Chen,W. and Zhao,F. (2009) Identification, expression, and characterization of the highly conserved D-xylose isomerase in animals. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **41**, 116-122.
- Dische, Z. and Borenfreund, E. (1951) A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses.
- Elkins,J.G., Podar,M., Graham,D.E., Makarova,K.S., Wolf,Y., Randau,L., Hedlund,B.P., Brochier-Armanet,C., Kunin,V., Anderson,I., Lapidus,A., Goltsman,E., Barry,K., Koonin,E.V., Hugenholtz,P., Kyrpides,N., Wanner,G., Richardson,P., Keller,M. and Stetter,K.O. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 8102-8107.
- Fiorentino,G., Cannio,R., Rossi,M. and Bartolucci,S. (2003) Transcriptional regulation of the gene encoding an alcohol dehydrogenase in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* involves multiple factors and control elements. *J Bacteriol.* **185**, 3926-3934.
- Frolow,F., Harel,M., Sussman,J.L., Mevarech,M. and Shoham,M. (1996) Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 452-458.
- Gerlt,J.A., Babbitt,P.C. and Rayment,I. (2005) Divergent evolution in the enolase superfamily: the interplay of mechanism and specificity. *Arch Biochem Biophys.* **433**, 59-70.
- Gottschalk,G. and Bender,R. (1982) D-Gluconate dehydratase from *Clostridium pasteurianum*. *Methods in Enzymology* **90 Pt E**, 283-287.
- Gouet,P., Robert,X. and Courcelle,E. (2003) ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3320-3323.

- Grohmann,D. and Werner,F. (2011) Recent advances in the understanding of archaeal transcription. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 328-334.
- Gui,L., Sunnarborg,A., Pan,B. and LaPorte,D.C. (1996) Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon. *J. Bacteriol.* **178**, 321-324.
- Harhangi,H.R., Akhmanova,A.S., Emmens,R., van der,D.C., de Laat,W.T., van Dijken,J.P., Jetten,M.S., Pronk,J.T. and Op den Camp,H.J. (2003) Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Arch. Microbiol.* **180**, 134-141.
- Hartman,A.L., Norais,C., Badger,J.H., Delmas,S., Haldenby,S., Madupu,R., Robinson,J., Khouri,H., Ren,Q., Lowe,T.M., Maupin-Furlow,J., Pohlschroder,M., Daniels,C., Pfeiffer,F., Allers,T. and Eisen,J.A. (2010) The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS. ONE.* **5**, e9605.
- Hausner,W., Wettach,J., Hethke,C. and Thomm,M. (1996) Two transcription factors related with the eucaryal transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB direct promoter recognition by an archaeal RNA polymerase. *J Biol. Chem* **271**, 30144-30148.
- HELLING,R.B. and WEINBERG,R. (1963) COMPLEMENTATION STUDIES OF ARABINOSE GENES IN ESCHERICHIA COLI. *Genetics* **48**, 1397-1410.
- Hempel,J., Nicholas,H. and Lindahl,R. (1993) Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci.* **2**, 1890-1900.
- Holmes,M.L. and Dyall-Smith,M.L. (2000) Sequence and expression of a halobacterial β -galactosidase gene. *Molecular Microbiology* **36**, 114-122.
- Holmes,M.L., Scopes,R.K., Moritz,R.L., Simpson,R.J., Englert,C., Pfeifer,F. and Dyall-Smith,M.L. (1997) Purification and analysis of an extremely halophilic β -galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim. Biophys. Acta* **1337**, 276-286.
- Horecker, B. L. (1988) D-Xylulose and D-Xylose. In *Methods of Enzymatic Analysis* ed. Bergmeyer,H.-U. pp. 465-473. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Hubbard,B.K., Koch,M., Palmer,D.R., Babbitt,P.C. and Gerlt,J.A. (1998) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: characterization of the (D)-glucarate/galactarate catabolic pathway in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 14369-14375.
- Huber H and Prangishvili D (2006) Sulfolobales. In *The Prokaryotes* pp. 23-51.
- Huber,H., Hohn,M.J., Rachel,R., Fuchs,T., Wimmer,V.C. and Stetter,K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-67.
- Hucho,F. and Wallenfels,K. (1972) Glucono- -lactonase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **276**, 176-179.

- Hurwitz,J. and Weissbach,A. (1959) The formation of 2-Keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B; II. Enzymic studies. *Journal of Biological Chemistry* **234**, 710-712.
- Jermyn,M.A. (1960) Studies on the glucono-delta-lactonase of *Pseudomonas fluorescens*. *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 78-92.
- Johnsen,U., Selig,M., Xavier,K.B., Santos,H. and Schönheit,P. (2001) Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* [published erratum appears in Arch.Microbiol. 2003 180: 503]. *Arch. Microbiol.* **175**, 52-61.
- Johnsen,U. and Schönheit,P. (2004) Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *J. Bacteriol.* **186**, 6198-6207.
- Johnsen,U., Dambeck,M., Zaiss,H., Fuhrer,T., Soppa,J., Sauer,U. and Schönheit,P. (2009) D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol. Chem* **284**, 27290-27303.
- Johnsen,U., Sutter,J.M., Zaiss,H. and Schönheit,P. (2013) L-Arabinose degradation pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of L-arabinose dehydrogenase. *Extremophiles*. **17**, 897-909.
- Jun,S.H., Reichlen,M.J., Tajiri,M. and Murakami,K.S. (2011) Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 27-40.
- Kandler,O. and König,H. (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol. Life Sci.* **54**, 305-308.
- Kawai,Y., Konishi,H., Horitsu,H., Sakurai,H., Takamizawa,K., Suzuki,T. and Kawai,K. (1994) Purification and characterization of D-xylose isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 691-694.
- Kim,S. and Lee,S.B. (2005) Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem J* **387**, 271-280.
- Kim,S. and Lee,S.B. (2008) Identification and characterization of the bacterial D-gluconate dehydratase in *Achromobacter xylosoxidans*. *Biotech. Bioprocess Eng.* **13**, 436-444.
- Kondo,Y., Inai,Y., Sato,Y., Handa,S., Kubo,S., Shimokado,K., Goto,S., Nishikimi,M., Maruyama,N. and Ishigami,A. (2006) Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5723-5728.
- Kuhn,J. and Binder,S. (2002) RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of cox2 transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **30**, 439-446.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lama,L., Nicolaus,B., Calandrelli,V., Romano,I., Basile,R. and Gambacorta,A. (2001) Purification and characterization of thermostable xylose(glucose) isomerase from *Bacillus thermoantarcticus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 234-240.
- Lamble,H.J., Milburn,C.C., Taylor,G.L., Hough,D.W. and Danson,M.J. (2004) Gluconate dehydratase from the promiscuous Entner-Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett* **576**, 133-136.
- Lamble,H.J., Theodossis,A., Milburn,C.C., Taylor,G.L., Bull,S.D., Hough,D.W. and Danson,M.J. (2005) Promiscuity in the part-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Letters* **579**, 6865-6869.
- Langworthy,T.A. and Pond,J.L. (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System. Appl. Microbiol.* **7**, 253-257.
- Lanyi,J.K. (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 272-290.
- Larkin,M.A., Blackshields,G., Brown,N.P., Chenna,R., McGettigan,P.A., McWilliam,H., Valentin,F., Wallace,I.M., Wilm,A., Lopez,R., Thompson,J.D., Gibson,T.J. and Higgins,D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **23**, 2947-2948.
- Lorca,G.L., Ezersky,A., Lunin,V.V., Walker,J.R., Altamentova,S., Evdokimova,E., Vedadi,M., Bochkarev,A. and Savchenko,A. (2007) Glyoxylate and pyruvate are antagonistic effectors of the Escherichia coli IclR transcriptional regulator. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 16476-16491.
- Lubelska,J.M., Jonuscheit,M., Schleper,C., Albers,S.V. and Driessen,A.J. (2006) Regulation of expression of the arabinose and glucose transporter genes in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* **10**, 383-391.
- Mevarech,M. and Werczberger,R. (1985) Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*. *J. Bacteriol.* **162**, 461-462.
- Miyada,C.G., Stoltzfus,L. and Wilcox,G. (1984) Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 4120-4124.
- Molina-Henares,A.J., Krell,T., Eugenia,G.M., Segura,A. and Ramos,J.L. (2006) Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev.* **30**, 157-186.
- Mota,L.J., Tavares,P. and Sa-Nogueira,I. (1999) Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **33**, 476-489.
- Mullakhanbhai,M.F. and Larsen,H. (1975) *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.* **104**, 207-214.
- Murakami,K.S. and Darst,S.A. (2003) Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 31-39.

- Nunn,C.E., Johnsen,U., Schönheit,P., Fuhrer,T., Sauer,U., Hough,D.W. and Danson,M.J. (2010) Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. *J Biol. Chem* **285**, 33701-33709.
- Nunoura,T., Takaki,Y., Kakuta,J., Nishi,S., Sugahara,J., Kazama,H., Chee,G.J., Hattori,M., Kanai,A., Atomi,H., Takai,K. and Takami,H. (2011) Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3204-3223.
- Oren,A., Ginzburg,M., Ginzburg,B.Z., Hochstein,L.I. and Volcani,B.E. (1990) *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 209-210.
- Oren,A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 334-348.
- Oren, A. (2007) Biodiversity in highly saline environments. In *Physiology and biochemistry of extremophiles* ed. Gerday,C. and Glansdorff,N. pp. 223-231. Washington, DC: ASM Press.
- Ouhammouch,M. (2004) Transcriptional regulation in Archaea. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 133-138.
- Pabo,C.O. and Sauer,R.T. (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095.
- Pan,B., Unnikrishnan,I. and LaPorte,D.C. (1996) The binding site of the IclR repressor protein overlaps the promoter of *aceBAK*. *J. Bacteriol.* **178**, 3982-3984.
- Paoli,M. (2001) An elusive propeller-like fold. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 744-745.
- Peng,N., Xia,Q., Chen,Z., Liang,Y.X. and She,Q. (2009) An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an archaeal promoter. *Molecular Microbiology* **74**, 928-939.
- Reher,M., Fuhrer,T., Bott,M. and Schönheit,P. (2010) The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3-deoxygluconate- specific aldolase. *J Bacteriol* **192**, 964-974.
- Sambrook, S., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schulz, Anne-Christine. Masterarbeit, 2014.
- Seegerer, A. and Stetter, K. O. (1992) The order *Sulfolobales*. In *The Prokaryotes* ed. Balows,A., Trüper,H.G., Dworkin,M., Harder,W. and Schleifer,K.H. pp. 684-701. New York: Springer-Verlag.
- Siebers,B. and Schönheit,P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 695-705.

- Song,S. and Park,C. (1997) Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *J Bacteriol* **179**, 7025-7032.
- Spang,A., Hatzenpichler,R., Brochier-Armanet,C., Rattei,T., Tischler,P., Spieck,E., Streit,W., Stahl,D.A., Wagner,M. and Schleper,C. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol.* **18**, 331-340.
- Staudigl,P., Haltrich,D. and Peterbauer,C.K. (2014) L-Arabinose isomerase and D-xylose isomerase from *Lactobacillus reuteri*: characterization, coexpression in the food grade host *Lactobacillus plantarum*, and application in the conversion of D-galactose and D-glucose. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 1617-1624.
- Stephens,C., Christen,B., Fuchs,T., Sundaram,V., Watanabe,K. and Jenal,U. (2007a) Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* **189**, 2181-2185.
- Stephens,C., Christen,B., Watanabe,K., Fuchs,T. and Jenal,U. (2007b) Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. *J Bacteriol* **189**, 8828-8834.
- Sutter, Jan-Moritz. Diplomarbeit, 2010.
- Thomm, M. (2007) Transcription: Mechanism and regulation. In *Archaea. Molecular and cellular biology* ed. Cavicchioli,R. pp. 139-157. Washington, DC: ASM Press.
- Torreblanca,M., Rodriguez-Valera,F., Juez,G., Ventosa,A., Kamekura,M. and Kates,M. (1986) Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* **8**, 89-99.
- Vieille,C., Hess,J.M., Kelly,R.M. and Zeikus,J.G. (1995) *xylA* cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1867-1875.
- Wainø,M., Tindall,B.J. and Ingvorsen,K. (2000) *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int. J Syst. Evol. Microbiol* **50 Pt 1**, 183-190.
- Watanabe,S., Kodaki,T. and Makino,K. (2006a) A novel α -ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase: evolutionary insight into an alternative pathway of bacterial L-arabinose metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 28876-28888.
- Watanabe,S., Shimada,N., Tajima,K., Kodaki,T. and Makino,K. (2006b) Identification and characterization of L-arabonate dehydratase, L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase, and L-arabinolactonase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism. Novel evolutionary insight into sugar metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 33521-33536.
- Woese,C.R. (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol. Rev.* **51**, 221-271.

- Woese,C.R., Kandler,O. and Wheelis,M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4576-4579.
- Zachariou,M. and Scopes,R.K. (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J Bacteriol.* **167**, 863-869.
- Zhang,R.G., Kim,Y., Skarina,T., Beasley,S., Laskowski,R., Arrowsmith,C., Edwards,A., Joachimiak,A. and Savchenko,A. (2002) Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the IclR transcriptional factor family. *J Biol. Chem* **277**, 19183-19190.
- Zhou,Y., Huang,H., Zhou,P. and Xie,J. (2012) Molecular mechanisms underlying the function diversity of transcriptional factor IclR family. *Cell Signal.* **24**, 1270-1275.
- Zillig,W., Stetter,K.O., Wunderl,S., Schulz,W., Priess,H. and Scholz,I. (1980) The *Sulfolobus*-*"Caldariella"* Group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerase. *Arch. Microbiol.* **125**, 259-269.

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar (Druckeinheit)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O _{dest.}	deionisiertes Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
M	molar
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NAD(P) ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat)
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
S	Substratkonzentration
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
U/mg	Spezifische Aktivität
UV	Ultraviolett
V	Geschwindigkeit des Substratumsatzes
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
°C	Grad Celsius

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Schönheit für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Förderung sowie für hilfreiche Diskussionen.

Frau Dr. U. Johnsen danke ich für die angenehme und produktive Zusammenarbeit, hilfreiche Diskussionen sowie die Hilfe bei vielen praktischen Fragen.

Herrn Prof. Dr. M. Bott (Jülich) danke ich für die Durchführung und Auswertung der MALDI-TOF Analysen der angereicherten Proteine.

Der DFG danke ich für die Finanzierung der Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie den von mir betreuten Praktikantinnen und Praktikanten am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt Marcel, Andreas P., Tom, Julia, Andreas R., Angelika, Kerstin, Holger und Dagmar.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meiner Frau Mirjam sowie meinen Kindern Lisa-Sophie und Jannes Anton, die mich während der Promotion in jeglicher Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Jan-Moritz Sutter
Geb. am: 22. Januar 1985
Geburtsort: Kiel
Nationalität: deutsch
Wohnort: Kiel

Schule:

1991 – 1995 Grundschule
1995 – 2004 Gymnasium
05.2004 Abitur

Studium:

10.2004 – 02.2010 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
03.2009 – 02.2010 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn. Prof. Dr. Peter Schönheit mit dem Thema: „Enzyme des Zuckerstoffwechsels in halophilen Archaea. Charakterisierung der Gluconat-Dehydratase und Xylonat-Dehydratase aus *Haloferax volcanii* und Analyse von Deletionsmutanten.“
06.2010 Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn. Prof. Dr. Peter Schönheit.